

Universidade Federal do Espírito Santo
Centro Tecnológico
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental

MARCOS VINICIUS NOGUEIRA LAVAGNOLI PEREIRA

**CULTIVO DE MICROALGAS AUTÓCTONES EM EFLUENTE DE
REATOR ANAERÓBIO: PROSPECÇÃO DE CEPAS E EFEITO DA
TAXA DE DILUIÇÃO NA PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA E
TRATAMENTO TERCIÁRIO**

VITÓRIA-ES
Outubro/2018

MARCOS VINICIUS NOGUEIRA LAVAGNOLI PEREIRA

**CULTIVO DE MICROALGAS AUTÓCTONES EM EFLUENTE DE
REATOR ANAERÓBIO: PROSPECÇÃO DE CEPAS E EFEITO DA
TAXA DE DILUIÇÃO NA PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA E
TRATAMENTO TERCIÁRIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental do Centro Tecnológico da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Sérvio Túlio Alves Cassini

VITÓRIA-ES
Outubro/2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter tido as oportunidades que tive na minha vida.

Dedico este trabalho à minha família, aos meus amigos, colegas, e a todos que contribuíram ou contribuem direta ou indiretamente com a pesquisa no Brasil.

"Tudo está em toda parte, mas o ambiente seleciona."

Baas-Becking, 1934 (tradução livre)

RESUMO

Efluentes do tratamento de esgotos sanitários são há muito reconhecidos como meios adequados para o cultivo de biomassa de microalgas. No entanto, poucos estudos relatam dados sobre a produtividade de biomassa em reatores contínuos utilizando efluentes não-esterilizados. Este estudo concentra-se em cepas autóctones de microalgas que crescem com bactérias nativas e são aplicáveis para a produção de biomassa e tratamento terciário. Inicialmente, sete cepas de Chlorophyta foram isoladas e cultivadas em batelada com o objetivo de prospectar um inóculo para os experimentos em modo de crescimento contínuo. A cepa *Chlorella* sp. L06 foi selecionada e avaliada com base em seis taxas de diluição de 0,1 a 0,6 dia⁻¹ em reatores de crescimento contínuo utilizando efluente secundário não-esterilizado como meio de cultura. A produtividade volumétrica máxima de biomassa foi de 283 mg L⁻¹ dia⁻¹ e foi obtida com taxa de diluição de 0,3 dia⁻¹, sem adição de CO₂, controle de pH ou aeração. Carboidratos foram a principal fração da biomassa seca, seguida de proteínas e lipídios. As maiores taxas de remoção de nitrogênio e fósforo total da fase líquida foram 13,0 e 1,4 mg L⁻¹ dia⁻¹, respectivamente, e foram obtidas com 0,4 dia⁻¹. A taxa de decaimento máxima para *E. coli* (2,9 dia⁻¹) foi atingida com 0,3 e 0,4 dia⁻¹. Conclusivamente, o cultivo de *Chlorella* sp. L06 em efluente anaeróbio secundário não-esterilizado pode ser ajustado dependendo do objetivo: para a produção de biomassa, recomenda-se uma taxa de diluição de aproximadamente 0,3 dia⁻¹; e para tratamento terciário sugere-se uma taxa de 0,4 dia⁻¹.

Palavras-chave: microalgas autóctones; biomassa; tratamento de efluentes; crescimento contínuo; produtividade

ABSTRACT

Effluents from municipal wastewater treatment have been long recognised as suitable media for the cultivation of microalgae biomass. However, few studies report data concerning biomass productivity in continuous reactors using unsterilised wastewater effluents. This study focuses on indigenous microalgae strains that grow with native bacteria and are applicable for biomass production and tertiary wastewater treatment in continuous growth mode. Initially, seven Chlorophyta strains were isolated and grown in batch mode to single out a potential inoculum for the experiments in continuous growth mode. The isolate *Chlorella* sp. L06 was selected and evaluated based on six dilution rates from 0.1 to 0.6 day⁻¹ on continuous growth reactor using unsterilised secondary effluent as culture medium. Maximal volumetric biomass productivity of 283 mg L⁻¹ day⁻¹ was achieved at 0.3 day⁻¹ without CO₂ addition, pH control or air bubbling. Carbohydrates were the major fraction of the dried biomass, followed by proteins and then lipids. The highest removal rates of total nitrogen and phosphorus from the liquid phase were 13.0 and 1.4 mg L⁻¹ day⁻¹, respectively, and were obtained at 0.4 day⁻¹. The maximal decay rate for *E. coli* (2.9 day⁻¹) was achieved both at 0.3 and 0.4 day⁻¹. Conclusively, *Chlorella* sp. L06 cultivation in unsterilised secondary anaerobic effluent can be adjusted depending on the objective: for biomass production, a dilution rate of approximately 0.3 day⁻¹ is recommended; and for tertiary treatment a rate of 0.4 day⁻¹ is suggested.

Keywords: indigenous microalgae; biomass; wastewater treatment; continuous growth; productivity

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. OBJETIVOS	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1. Tratamento de esgotos sanitários	13
3.2. Microalgas	18
3.2.1. Relevância ambiental e econômica	18
3.2.2. Isolamento, identificação e manutenção de espécies	21
3.2.3. Nutrição e metabolismo	23
3.3. Cultivo de microalgas para produção de biomassa.....	29
3.3.1. Parâmetros cinéticos de crescimento.....	29
3.3.2. Regimes de cultivo	31
3.3.3. Fatores relevantes para o cultivo	37
3.3.4. Reatores para produção de biomassa	46
3.4. Cultivo de microalgas em efluentes	48
3.4.1. Produção de biomassa	49
3.4.2. Remoção de nutrientes	50
3.4.3. Remoção ou inativação de microrganismos patógenos.....	52
3.4.4. Desafios de cultivos em efluentes e estratégias para superá-los	54
4. RESUMO GRÁFICO DA PESQUISA	58
5. ARTIGO 1:	59
5.1. Materiais e métodos	59
5.1.1. Descrição das áreas de estudo	59
5.1.2. Isolamento e identificação de microalgas	60
5.1.3. Coleta e caracterização do efluente de UASB para cultivo	61
5.1.4. Cultivo de microalgas em batelada com efluente não-esterilizado	62
5.1.5. Análise estatística	65
5.2. Resultados e discussão	66
5.2.1. Isolamento e identificação das microalgas	66
5.2.2. Perfil físico-químico e microbiológico do ENE.....	68
5.2.3. Desempenho das cepas isoladas	69
5.3. Conclusões	80
6. ARTIGO 2:	81
6.1. Materiais e métodos	81

6.1.1. Coleta e análise do efluente de UASB para cultivo	81
6.1.2. Escolha e manutenção do inóculo	83
6.1.3. Equipamentos e condições experimentais do cultivo.....	83
6.1.4. Métodos analíticos.....	86
6.1.5. Análise estatística.....	91
6.2. Resultados e discussão	91
6.2.1. Concentração de biomassa e produtividade em regime contínuo	91
6.2.2. Taxas de remoção de nutrientes e DQO.....	95
6.2.3. Destino do nitrogênio	99
6.2.4. Remoção/inativação de bactérias e bioindicadores	101
6.2.5. Composição bioquímica da biomassa	104
7. CONCLUSÕES GERAIS E RECOMENDAÇÕES	107
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109

1. INTRODUÇÃO

Desde a sua concepção, as estações de tratamento de esgoto (ETEs) desempenham um papel crucial na melhoria dos ambientes hídricos em nível global. Até há pouco tempo, as ETEs eram projetadas com o único propósito de proteger a saúde humana e ambiental. No entanto, uma mudança de paradigma está atualmente em curso no campo do tratamento de esgotos sanitários, onde o foco no tratamento em si dá lugar ao foco na recuperação de recursos como água, nutrientes, e biomassa (PUYOL *et al.*, 2016). Processos tecnológicos baseados em microrganismos são considerados pela comunidade acadêmica como uma das melhores maneiras de se aplicar a lógica dessa recuperação de recursos, contribuindo com o longo caminho até a economia circular (STILES *et al.*, 2018).

As tecnologias baseadas em microalgas se encaixam perfeitamente neste cenário, uma vez que esses microrganismos apresentam taxas de crescimento rápidas, podem ser cultivados em terras não-aráveis utilizando efluentes como meio de cultura, oferecem sequestro de CO₂ e promovem tratamento terciário de vários tipos de efluentes (ARITA *et al.*, 2015). De fato, Oswald e Gotaas (1957) propuseram pela primeira vez a aplicação de microalgas ao tratamento de efluentes na década de 1950 e, desde então, as lagoas de alta taxa (LATs) têm sido extensivamente estudadas. No entanto, a biomassa de microalgas produzida nesses sistemas não tem sido comumente recuperada para a produção de bioenergia, devido principalmente às baixas produtividades e à ausência de tecnologias de colheita eficazes e de baixo custo (McGINN *et al.*, 2012).

Tradicionalmente, a produção de biomassa de microalgas para transformação em biocombustíveis utiliza fertilizantes químicos e água da rede de distribuição, sendo os altos custos para o cultivo um dos principais gargalos para a aplicação desses sistemas

em escala real (BRASIL *et al.*, 2017). Além disso, a viabilidade em curto prazo dessas tecnologias tradicionais torna-se claramente questionável quando analisa-se o balanço energético, o uso de recursos e os impactos ambientais da etapa de cultivo, sob a perspectiva das análises de ciclo de vida (COLLET *et al.*, 2013; SILLS *et al.*, 2013; CLARENS *et al.*, 2010). Por essa razão, pressupõe-se que, para melhorar a sustentabilidade e a viabilidade econômica dos sistemas de produção de microalgas para biocombustíveis, devem ser usadas fontes alternativas de água e nutrientes. Para tanto, efluentes do tratamento de esgotos sanitários podem ser usados como fonte de água e nutrientes para as microalgas, uma vez que esses cultivos não requerem um alto nível de pureza nas culturas, conforme necessário para aplicações na indústria farmacêutica ou alimentícia. De fato, numerosos autores já alcançaram altas produtividades de biomassa ao cultivar microalgas em efluentes do tratamento de esgotos sanitários, como evidenciado por uma recente revisão sobre o assunto (LV *et al.*, 2017).

Vários tipos de efluentes podem ser usados para esse fim, como esgoto bruto, efluentes primários, secundários, e de desaguamento de lodo, porque contêm nitrogênio, fósforo e micronutrientes em quantidades que promovem o crescimento de microalgas (ARITA *et al.*, 2015). Dentre os diferentes tipos de efluentes, os do tratamento anaeróbico de esgoto são um recurso pouco explorado, mas muito promissor, devido à sua baixa turbidez, carga orgânica, e porque a maioria do seu conteúdo de nitrogênio está na forma de amônio – discutivelmente a forma preferida para assimilação pelas microalgas. Tanto o nitrogênio quanto o fósforo são as principais causas de eutrofização nos corpos d'água receptores, portanto sua concentração deve ser adequadamente reduzida antes do lançamento. Diversos estudos demonstram que as microalgas são capazes de reduzir a concentração de fósforo e nitrogênio de efluentes em até 99%, segundo uma recente meta-análise realizada por Lv e colaboradores (2017).

Adicionalmente, o uso de culturas binárias (e.g. microalgas-bactérias) pode ser uma boa prática para a produção de biomassa e tratamento terciário de efluentes, considerando que a esterilização dos meios de cultivo é uma prática custosa e impossível de se aplicar em escala real. De fato, microalgas e bactérias podem sinergizar, trocando nutrientes e metabólitos, transferindo genes e interagindo umas com as outras através de mecanismos metabólicos complexos, como o *quorum sensing* (RASHID *et al.*, 2018). Além disso, as bactérias se alimentam de matéria orgânica, usando o oxigênio produzido pelas microalgas, enquanto liberam CO₂ para as microalgas em troca.

Pode-se sugerir, com base na discussão de Cho e colaboradores (2017), que as microalgas nativas do tipo de efluente utilizado como meio de cultivo apresentariam maior adaptabilidade para o crescimento e remoção de nutrientes do mesmo. Também é importante entender o comportamento das cepas nos efluentes, com o objetivo de alcançar taxas máximas de produtividade de biomassa e remoção de nutrientes, com foco em um sistema de produção de microalgas em larga escala que seria adequado para operar em associação com ETEs. Infelizmente, poucos estudos focam no crescimento de microalgas em modo contínuo com efluentes não-esterilizados, que são condições necessárias para a implementação desse tipo de tecnologia, e menos estudos ainda focam em efluentes do tratamento anaeróbio de esgoto. Além disso, foram encontrados poucos relatos de taxas de decaimento de bioindicadores de contaminação nesses sistemas e, considerando a importância do controle de patógenos na reciclagem de água, chama-se atenção para a inclusão da análise de *Escherichia coli* e/ou outros bioindicadores em estudos futuros sobre o cultivo de microalgas em efluentes reais.

No presente estudo, o efluente de um reator anaeróbio foi utilizado para o isolamento e cultivo de cepas de microalgas em regime de batelada, a fim de identificar a mais promissora para operação em modo contínuo de crescimento. O objetivo geral foi

investigar a influência das taxas de diluição na produtividade e composição da biomassa, remoção de nutrientes, e taxas de decaimento de *E. coli* do sistema em modo contínuo de operação. Esses dados empíricos podem ser usados para alimentar modelos e análises de ciclo de vida (ACV ou LCA) da produção de biocombustíveis de biomassa microalgácea em conjunto com o tratamento terciário de efluentes.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral da presente tese foi investigar a influência da taxa de diluição na produtividade e composição da biomassa, remoção de nutrientes e *E. coli* de um cultivo de uma espécie autóctone de microalga utilizando efluente não-esterilizado de reator UASB tratando esgoto doméstico como meio de cultivo.

Os objetivos específicos se constituíram em:

- Isolar, identificar e manter um banco de microalgas que se desenvolvem naturalmente (autóctones) no efluente de reator UASB;
- Prospectar espécies potenciais para produção de biomassa e tratamento terciário utilizando efluente não-esterilizado de UASB como meio de cultura;
- Cultivar a espécie com maior potencial em um fotobiorreator de bancada, sob regime contínuo de crescimento e utilizando o efluente de UASB não-esterilizado como meio;
- Investigar a influência da taxa de diluição na produtividade e composição da biomassa, remoção de nutrientes e *E. coli* desses cultivos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Tratamento de esgotos sanitários

As tecnologias de tratamento de esgoto sanitário são processos que visam à redução ou remoção de agentes poluentes no esgoto. Essas tecnologias foram concebidas utilizando como principal referência o lançamento dos efluentes em corpos d'água, pois elevadas concentrações de nutrientes (N e P) e carga orgânica afetam negativamente os frágeis ecossistemas aquáticos. O fenômeno da eutrofização, um dos maiores problemas ambientais resultantes do lançamento inadequado de efluentes, pode resultar na redução ou até inviabilização dos usos múltiplos do corpo hídrico receptor (FLORENCIO *et al.*, 2006). Contudo, ecossistemas aquáticos possuem uma capacidade natural de ciclagem de matéria orgânica e nutrientes, porém essa capacidade é pequena se comparada à quantidade de esgoto produzida. Assim sendo, o tratamento de esgotos sanitários é essencial para reduzir sua carga orgânica e concentração de macronutrientes, bem como a inativação ou remoção de uma miríade de organismos patogênicos e compostos químicos tóxicos à saúde humana e biota aquática (CHERNICHARO *et al.*, 2001).

Comumente, cerca de 99% da composição de esgotos sanitários constitui-se de água. Dentre os restantes destacam-se: compostos orgânicos (proteínas: 40% a 60%; carboidratos 25% a 50%; e óleos e graxas: 10%); sólidos suspensos, sedimentáveis e dissolvidos; nutrientes (N e P); sais; metais; organismos patogênicos e ambientais; e, ocasionalmente, contaminantes tóxicos decorrentes de atividades industriais ou acidentais (ANDRADE NETO & CAMPOS, 1999). As características físico-químicas gerais dos esgotos sanitários são apresentadas na Tabela 1. Tendo em vista a complexidade desse tipo de efluente e as limitações de cada tipo de tratamento, torna-se claro que são

necessários mais de um tipo de processo operando em sequência para se chegar à qualidade desejada do efluente final.

Tabela 1. Características físico-químicas gerais dos esgotos sanitários.

Parâmetro	Concentração		
	Unidade	Faixa	Típico
Sólidos Totais	mg/L	700 - 1350	1100
Sólidos em Suspensão	mg/L	200 - 450	350
Fixos	mg/L	40 - 100	80
Voláteis	mg/L	165 - 350	320
Sólidos Dissolvidos	mg/L	500 - 900	700
Fixos	mg/L	300 - 550	400
Voláteis	mg/L	200 - 350	300
Sólidos Sedimentáveis	mg/L	10 - 20	15
Matéria Orgânica			
DBO ₅	mg O ₂ /L	250 - 400	300
DQO	mg O ₂ /L	450 - 800	600
Nitrogênio Total	mg N/L	35 - 60	45
Nitrogênio Orgânico	mg N/L	15 - 25	20
Nitrogênio Amoniacal	mg NH ₄ ⁺ - N/L	20 - 35	25
Nítrito	mg NO ₂ ⁻ - N/L	≈ 0	≈ 0
Nitrato	mg NO ₃ ⁻ - N/L	0 - 1	≈ 0
Fósforo Total	mg P/L	4 - 15	7
Fósforo Orgânico	mg P/L	1 - 6	2
Fósforo Inorgânico	mg PO ₄ ³⁻ - P/L	3 - 9	5
pH	-	6,7 - 8,0	7,0
Alcalinidade	mg CaCO ₃ /L	100 - 250	200

Fonte: adaptado de von Sperling (2005).

O tratamento do esgoto sanitário tem seu início na rede coletora, a qual tem como função transportar o mesmo até a Estação de Tratamento de Esgotos (ETE). A ETE é a unidade responsável pelo tratamento do esgoto e destinação dos subprodutos ali gerados, e os tipos de tratamento de esgoto podem ser divididos em níveis de acordo com o grau de remoção de poluentes ao qual se deseja atingir (VON SPERLING, 2005). O tratamento preliminar, essencialmente um processo físico, envolve a remoção de sólidos grosseiros através do peneiramento por grades, bem como a sedimentação de areia em unidades de

desarenação. Esta etapa preliminar é seguida pelo tratamento primário, que tem como principal função a remoção de sólidos suspensos sedimentáveis (matéria orgânica em suspensão) e sólidos flutuantes (óleos e graxas) através da sedimentação e flotação, respectivamente, em unidades denominadas decantadores primários. Após essa etapa o efluente primário, em teoria já desprovido de parte de sua matéria orgânica em suspensão, é encaminhado para o tratamento secundário. Existem diversos tipos de tratamento secundário, como lagoas de estabilização, reatores anaeróbios e lodos ativados, e essas tecnologias são baseadas em processos biológicos (VON SPERLING, 2005). Essencialmente o tratamento secundário se consiste em acelerar os processos naturais de decomposição de matéria orgânica por microrganismos (e.g. bactérias, fungos) em ambientes controlados, como tanques, lagoas ou reatores.

Entretanto, mesmo após os tratamentos citados acima, o efluente gerado ainda contém poluentes que são mais difíceis de serem removidos, como nutrientes (N e P) e organismos patogênicos, o que pode impactar negativamente o corpo receptor (MOTA & VON SPERLING, 2009). Como etapa adicional, existem tratamentos terciários, que se consistem principalmente no polimento do efluente através da remoção de nutrientes e organismos patogênicos do mesmo. Exemplos de tratamentos terciários, que podem ter natureza física e/ou biológica, incluem: lagoas de maturação; desinfecção (e.g. cloração, ozonização); processos de remoção de nutrientes (e.g. Bardenpho, Anammox); e filtração avançada. Contudo, a inclusão da etapa de tratamento terciário pode acarretar em um aumento expressivo de custos nas ETEs, não sendo justificável em muitas ocasiões.

Efetivamente, quem dita o nível mínimo de tratamento que os efluentes devem receber é a legislação vigente, através dos padrões de qualidade para lançamento. A partir de 2011 a legislação brasileira flexibilizou alguns limites para lançamento de efluentes com o estabelecimento da atual Resolução CONAMA Nº 430/2011 (BRASIL, 2011).

Para efluentes provenientes de tratamento sanitário, parâmetros como fósforo e nitrogênio total não foram incluídos, deixando cada estado responsável pela sua possível inclusão para melhor refletir a realidade local. A Tabela 2 demonstra os parâmetros da legislação brasileira atual em comparação com os parâmetros da legislação europeia de lançamento, uma das mais restritivas em vigência no mundo (COMISSÃO EUROPEIA, 1998).

Tabela 2. Concentrações limite para lançamento de efluentes de tratamento de esgoto sanitário segundo os padrões brasileiro e europeu.

Parâmetro	Concentração limite ou Condição	
	CONAMA N° 430/2011 (BRASIL, 2011)	Diretiva 91/271/EEC (COMISSÃO EUROPEIA, 1998)
DQO	Não há	125 mg O ₂ /L
DBO ₅	120 mg O ₂ /L ou 60% de remoção mediante estudo de autodepuração do corpo hídrico receptor	Não há, a concentração limite é definida por DQO ou conversão de outros parâmetros para DQO
Nitrogênio Total	Não há, a concentração limite é aplicada apenas para nitrogênio amoniacal (20 mg NH ₄ ⁺ - N/L)	10 mg N/L
Fósforo Total	Não há	1 mg P/L

Fonte: adaptado de Brasil (2011) e Comissão Europeia (1998).

Von Sperling (2016) discute que o motivo da flexibilização da nova legislação foi o de permitir a implementação de sistemas mais simples e menos eficientes de tratamento como os Reatores Anaeróbios de Manta de Lodo (UASB). A simplicidade dos sistemas teoricamente ampliaria a cobertura de esgotamento sanitário no Brasil, que atualmente trata apenas 42,7% de todo o esgoto produzido (BRASIL, 2017). Assim, futuramente, as melhorias nos sistemas de tratamento resultariam em efluentes com melhor qualidade. Em relação às características favoráveis dos sistemas anaeróbios de tratamento, estas incluem o baixo custo de operação, baixa geração de lodo e a produção de energia na forma de biogás. Algumas destas vantagens podem ser melhor

compreendidas através da Figura 1, onde fatores intrínsecos dos processos anaeróbios de tratamento são comparados com os dos processos aeróbios. Estas vantagens aliadas às condições climáticas favoráveis do nosso país tem tornado os sistemas anaeróbios uma opção viável para o Brasil, particularmente os reatores UASB.

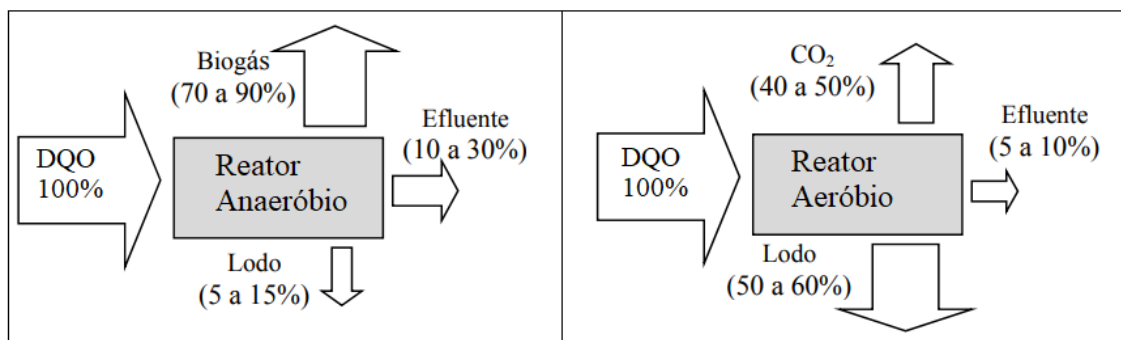


Figura 1. Conversão biológica nos sistemas anaeróbios e aeróbios.

Fonte: Chernicharo *et al.* (2001).

Entretanto, como pode ser observado na Figura 1, os sistemas anaeróbios possuem uma eficiência menor na remoção de matéria orgânica quando comparados com os sistemas aeróbios, visto que o efluente gerado no primeiro ainda mantém uma parcela considerável da DQO inicial. Ademais, a menor produção de lodo faz com que sistemas anaeróbios removam menos nitrogênio e fósforo que os aeróbios, apesar de reduzirem o custo do tratamento justamente por gerarem menos lodo. A ineficiência na remoção de nutrientes faz com que seja necessário um polimento nos efluentes gerados por sistemas anaeróbios de tratamento, e processos aeróbios (e.g. lagoas de polimento, biofiltros aerados submersos) podem ser empregados com essa finalidade (GONÇALVES *et al.*, 2001; KATO *et al.*, 1999).

As microalgas vêm sendo introduzidas como uma solução economicamente viável para polimento de efluentes anaeróbios, pois absorvem grandes quantidades de nitrogênio

e fósforo para seu crescimento e possuem alta produtividade por unidade de área. A biomassa produzida pode ser recuperada para reciclagem de nutrientes ou extração de produtos como pigmentos e produção de biocombustíveis (ARIAS *et al.*, 2018). Ademais, a remoção de nutrientes aliada à possível remoção ou inativação de microrganismos indicadores como *Escherichia coli* (GUTIÉRREZ-ALFARO *et al.*, 2018; POSADAS *et al.*, 2015) faz com que processos baseados em cultivo de microalgas sejam enquadrados como tratamento terciário, contanto que a biomassa produzida seja devidamente removida da fase líquida antes do lançamento ou reuso. No Brasil, as condições climáticas (insolação e temperatura) favorecem sistemas de tratamento baseados na atividade fotossintética e, de fato, lagoas de estabilização estão entre os sistemas de tratamento mais utilizados no país (VON SPERLING, 2016).

3.2. Microalgas

3.2.1. Relevância ambiental e econômica

O termo microalga – ou fitoplâncton – refere-se a um agrupamento biológico polifilético, não coesivo e artificial, que abrange microrganismos algáceos com clorofila *a* e outros pigmentos fotossintéticos, os quais são capazes de realizar a fotossíntese oxigênica (ANDRADE *et al.*, 2014). Sob a denominação microalga estão incluídos microrganismos com dois tipos de estrutura celular: estrutura procariótica, com representantes no filo Cyanobacteria; e estrutura celular eucariótica, com representantes nas divisões Chlorophyta, Euglenophyta, Rhodophyta, Haptophyta, Bacillariophyta, Cryptophyta, Chrysophyta, Phaeophyta e Dinophyta, segundo Raven e colaboradores (2005). Apesar das diferenças estruturais e morfológicas entre os representantes de cada divisão, estes são fisiologicamente similares e apresentam um metabolismo análogo àquele das plantas.

As microalgas são encontradas principalmente no meio marinho, límnico e até em ambientes terrestres, distribuídas em praticamente todo o globo, tolerando ampla faixa de temperatura, radiação, turbidez, salinidade, concentração de O₂ e CO₂ (GEADA *et al.*, 2017; ANDRADE *et al.*, 2014). Elas são responsáveis por pelo menos 60% da produção primária da Terra e maior parte da produção de gás oxigênio (ROSSI *et al.*, 2014; LOURENÇO, 2006), sustentando direta e indiretamente as teias alimentares aquáticas. O número exato de espécies de microalgas ainda é desconhecido, entretanto há relatos na literatura que estimam a existência de mais de 100.000 espécies, sendo que apenas 40.000 destas estão devidamente descritas (GUIRY, 2012).

Tal diversidade também se reflete na composição bioquímica destes seres e, assim sendo, podem ser fonte de uma quantidade variada de produtos (LARKUM *et al.*, 2012; PULZ & GROSS, 2004; NORTON *et al.*, 1996). Como pode ser observado na Tabela 3, diferentes espécies de microalgas possuem diferentes perfis de composição bioquímica, apesar da composição também estar intimamente ligada às condições de cultivo da espécie em questão (McGINN *et al.*, 2012). Algumas espécies sintetizam compostos altamente tóxicos para outros organismos, inclusive para o homem, como é o caso das cianotoxinas. Entretanto, as aplicações comerciais das microalgas são amplas e abrangem principalmente a indústria alimentícia, química e farmacêutica.

Tabela 3. Composição bioquímica de diferentes espécies de microalgas.

Espécie	Porcentagem (%) da massa seca			
	Proteínas	Carboidratos	Lipídeos	Ácidos nucleicos
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50 - 56	10 - 17	12 - 14	3 - 6
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	47	-	1 - 9	-
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8 - 18	21 - 52	16 - 40	-
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	51 - 58	12 - 17	14 - 22	4 - 5
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2	-
<i>Spirogyra</i> sp.	6 - 20	33 - 64	11 - 21	-
<i>Dunaliella bioculata</i>	49	4	8	-
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6	-
<i>Euglena gracilis</i>	39 - 61	14 - 18	14 - 20	-
<i>Prymnesium parvum</i>	28 - 45	25 - 33	22 - 38	1 - 2
<i>Tetraselmis maculata</i>	52	15	3	-
<i>Porphyridium cruentum</i>	28 - 39	40 - 57	9 - 14	-
<i>Spirulina platensis</i>	46 - 63	8 - 14	4 - 9	2 - 5
<i>Spirulina maxima</i>	60 - 71	13 - 16	6 - 7	3 - 5
<i>Synechococcus</i> sp.	63	15	11	5
<i>Anabaena cylindrica</i>	43 - 53	25 - 30	4 - 7	-

Fonte: adaptado de Becker (1994).

Outra aplicação biotecnológica que vêm retomando a atenção de pesquisadores nas últimas décadas é a produção de biomassa microalgácea, que dentre outras utilidades, pode ser usada como fonte renovável de energia (BRENNAN & OWENDE, 2010). Por serem organismos fotossintéticos, as microalgas são capazes de converter energia luminosa, água, gás carbônico e nutrientes inorgânicos em biomassa com compostos orgânicos diversificados. Microalgas crescem com uma eficiência maior que plantas terrestres, pois além de possuírem estrutura celular simples, sem a presença de tecidos diferenciados como caule ou folhas, apresentam elevada relação superfície/volume, o que lhes confere altas taxas de assimilação de nutrientes e CO₂ (LAM & LEE., 2012).

Em alguns casos, segundo Yue e colaboradores (2014), microalgas podem atingir taxas de crescimento de até uma ordem de magnitude acima dos cultivares terrestres, sem o requerimento de áreas cultiváveis. A biomassa produzida pode ser então processada e transformada em biocombustíveis como biogás ou biodiesel, com o potencial de atingir produtividades notáveis, como pode-se observar na Tabela 4. Entretanto, cabe ressaltar que os valores de produtividade desta tabela, no caso das microalgas, são frutos de extrapolações e provavelmente não corresponderiam à realidade caso fossem postos à prova em escala real.

Tabela 4. Comparação do conteúdo lipídico, rendimento em óleo e produtividade de biodiesel entre microalgas e outros cultivares.

Cultivar	Conteúdo lipídico (% da massa seca)	Rendimento em óleo (L ha ⁻¹ ano ⁻¹)	Produtividade de biodiesel (kg ha ⁻¹ ano ⁻¹)
Milho	44	172	152
Pinhão-manso	41 - 59	741	656
Mamona	48	1.307	1.156
Palma	36	5.366	4.747
Microalga (conteúdo lipídico baixo)	30	58.700	51.927
Microalga (conteúdo lipídico mediano)	50	97.800	86.515
Microalga (conteúdo lipídico alto)	70	136.900	121.104

Fonte: adaptado de Medipally *et al.* (2015).

3.2.2. Isolamento, identificação e manutenção de espécies

Para se elucidar as diferentes respostas e comportamentos das espécies de microalgas, realiza-se tradicionalmente uma série de experimentos controlados, nos quais há a necessidade de se isolar previamente a espécie a ser estudada. Entretanto, apenas algumas dentre as mais de 70.000 espécies de microalgas conhecidas são passíveis de

serem isoladas e cultivadas com sucesso, ao passo que muitas são aparentemente impossíveis de se cultivar (ANDERSEN & KAWACHI, 2005). Habitualmente, a primeira etapa para se isolar uma microalga se consiste em entender as condições do ambiente do qual se pretende isolar a espécie, com o objetivo de mimetizar tais condições no meio de cultivo que será utilizado. Em seguida deve-se isolar a espécie-alvo, removendo da amostra os contaminantes de natureza química e biológica. Para tanto, os métodos padrão incluem: filtração seletiva; diluições seriadas; enriquecimento de culturas; micropipetagem; esgotamento por estrias em meio-ágar; arraste em meio-ágar; pulverização de células; separação gravimétrica; fototaxia e uso de antibióticos (ANDERSEN & KAWACHI, 2005; GUILLARD, 2005). Após o isolamento da espécie, deve-se realizar a manutenção das culturas, normalmente feita através da transferência de subculturas para novos recipientes com meio líquido esterilizado ou placas com meio-ágar, quinzenalmente (LORENZ *et al.*, 2005). Pode-se então estabelecer um banco de espécies isoladas, que podem ser renovadas de acordo com os procedimentos acima ou armazenadas com criopreservação.

Em relação à identificação de microalgas *in vivo*, cabe ressaltar que esta deve ser preferencialmente realizada assim que o microrganismo for coletado, sem que tenha passado por muitas gerações dentro do laboratório. O motivo é a plasticidade fenotípica (WEST-EBERHARD, 1989), fenômeno que confere características morfológicas distintas às microalgas frente à certas variações ambientais – como a transição de um ambiente natural para um artificial – o que dificulta a identificação posterior. Alguns exemplos de plasticidade fenotípica incluem alterações no tamanho das células, forma e estrutura da parede celular, formação de colônias e espinhos. De fato, um dos maiores desafios na exploração da diversidade natural das microalgas refere-se à taxonomia destes microrganismos (ANDRADE *et al.*, 2014). A identificação das espécies é realizada,

principalmente, através observação de caracteres morfológicos ao microscópio óptico, que são utilizados para reconhecimento com base em chaves específicas para cada grupo (LOURENÇO, 2006).

A bibliografia utilizada por Mendes e colaboradores (2012) para identificar microalgas de ambientes dulciaquícolas promissoras para produção de biocombustíveis inclui os trabalhos de: Komárek e Marvan (1992), González (1996), Bicudo e Menezes (2005), Menezes e Bicudo (2008), Fanés e colaboradores (2009) para a divisão Chlorophyta; Round (1990) para Bacillariophyta, Chrysophyta e Phaeophyta; e Komárek e Anagnostidis (1999) para o filo Cyanobacteria. Apesar de caracteres morfológicos serem a forma mais utilizada para identificação de microalgas, sabe-se que em alguns casos não são completamente confiáveis, ao menos para nível de espécie. Sob outra perspectiva, a identificação pode ser realizada através de técnicas moleculares utilizando análises de sequências da porção 18S do RNA ribossômico, como realizado por Jebali e colaboradores (2015) e Mahapatra e demais autores (2014) em seus estudos sobre cultivo de microalgas. Cabe ressaltar ainda que a evolução destes microrganismos e estabelecimento das relações filogenéticas entre os seus grupos ainda são temas discutíveis na literatura e sujeitos a diferentes interpretações, principalmente após os adventos da genômica e proteômica.

3.2.3. Nutrição e metabolismo

3.2.3.1 Necessidades nutricionais

A maioria das espécies de microalgas têm requerimentos nutricionais simples, se comparadas com outros tipos de microrganismos como fungos e bactérias. Para o crescimento, microalgas necessitam de: hidrogênio (H), carbono (C), e oxigênio (O), que

no metabolismo fotoautotrófico são obtidos das moléculas H_2O e CO_2 ; macronutrientes como nitrogênio (N), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), fósforo (P) e enxofre (S); e micronutrientes como ferro (Fe), boro (B), manganês (Mn), sódio (Na), zinco (Zn), cobre (Cu), cobalto (Co), silício (Si) e molibdênio (Mo), como pode-se observar na Tabela 5.

Tabela 5. Composição elementar média da biomassa seca de microalgas e faixa de variação dos valores.

Elemento	Concentração na biomassa seca de microalgas ($\mu g\ mg^{-1}$)	
	Valor típico	Faixa de variação
Carbono (C)	430	175 - 650
Oxigênio (O)	275	205 - 330
Hidrogênio (H)	65	29 - 100
Nitrogênio (N)	55	10 - 140
Silício (Si)	54	0 - 230
Potássio (K)	17,3	1 - 75
Fósforo (P)	11,0	0,5 - 75
Cálcio (Ca)	8,7	0 - 40
Magnésio (Mg)	5,6	0,5 - 75
Enxofre (S)	5,9	1,5 - 16
Ferro (Fe)	5,9	0,2 - 34
Sódio (Na)	6,1	0,4 - 47
Manganês (Mn)	0,06	0,02 - 0,24
Zinco (Zn)	0,28	0,005 - 1
Boro (B)	0,03	0,001 - 0,25
Cobre (Cu)	0,1	0,006 - 0,3
Cobalto (Co)	0,06	0,0001 - 0,2
Molibdênio (Mo)	0,0008	0,0002 - 0,001

Fonte: adaptado de Hecker & Kilham (1988).

Tanto os macro quanto os micronutrientes devem estar dissolvidos na fase líquida do cultivo (biodisponíveis) para que as microalgas possam absorvê-los, sendo a assimilação e necessidade dos mesmos dependentes do tipo de espécie, razões entre os

nutrientes, pH e temperatura, dentre outros fatores (ANDRADE *et al.*, 2014). Consequentemente, essas variações na capacidade de assimilação dentre as microalgas motivaram diversas pesquisas relacionadas à determinação da concentração ótima de nutrientes para as espécies de interesse econômico. No entanto, de uma forma geral, carbono, nitrogênio e fósforo são considerados os elementos mais importantes para o crescimento de microalgas.

Indubitavelmente, o carbono é o elemento mais importante dentre todos os mencionados, visto que a fórmula estequiométrica geral de uma célula de microalga é $C_{106}H_{181}O_{45}N_{16}P$ (OSWALD, 1988). No metabolismo fotoautotrófico, ele é absorvido do CO_2 dissolvido no meio líquido circundante, enquanto que no crescimento heterotrófico é absorvido de compostos orgânicos como açúcares ou acetatos. Os tipos de metabolismo (autotrófico, heterotrófico e mixotrófico) são abordados com detalhes nas três próximas seções. Apesar de ser considerado como o elemento mais importante, a concentração de carbono na biomassa de microalgas pode variar de 17,5% a 65,0%, como pode-se inferir pela Tabela 5.

O nitrogênio, compondo de 1% a 14% da biomassa de microalgas, é rotulado como o segundo elemento mais relevante para o crescimento, sendo que sua limitação no meio (estresse nutricional) engatilha processos metabólicos específicos para a produção de compostos de reserva energética, como lipídeos e carboidratos (CHISTI, 2007; MARKOU *et al.*, 2012). Esse fato contribuiu para aumentar a visibilidade das microalgas como matéria-prima para produção de biocombustíveis – principalmente biodiesel –, pois através da imposição de estresse nutricional, quantidades expressivas de lipídeos e carboidratos podem ser produzidos por muitas espécies, como pode-se observar na Tabela 3. Dentre as formas químicas do nitrogênio, as microalgas assimilam preferencialmente o amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-) pois requerem menos energia para assimilação, porém

na ausência destas o absorvem do nitrito (NO_2^-) ou ureia ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) (LARSDOTTER, 2006). Por outro lado, o excesso de algumas formas de nitrogênio, como o próprio amônio e o nitrito, é tóxico para a maioria das espécies de microalgas (BOROWITZKA, 1998).

Devido ao seu papel no desenvolvimento e diferentes processos celulares de transferência de energia e síntese de DNA, o fósforo (P) também é um dos elementos-chave para o crescimento das microalgas. A forma química assimilável desse elemento é o ortofosfato (PO_4^{3-}), entretanto, quando há escassez desta forma inorgânica no meio, fosfatos orgânicos podem ser convertidos a ortofosfato por enzimas (fosfatases) na superfície celular (LARSDOTTER, 2006). Ademais, as microalgas são capazes de assimilar fósforo em excesso, fato que é denominado “consumo de luxo”, onde fósforo é absorvido e reservado no interior das células na forma de grânulos de polifosfato (ELRIFI & TURPIN, 1985). As reservas deste elemento podem ser utilizadas para o crescimento mesmo sob condições de estresse de fósforo, o que faz que a microalga não responda tão prontamente à mudanças na sua concentração no meio, como responde à variações de luminosidade ou temperatura (FOGG, 1975).

3.2.3.2. Autotrofia

Em um sentido amplo, as microalgas podem ser autotróficas ou heterotróficas, sendo a autotrofia nitidamente a forma de nutrição mais importante e mais usada nos cultivos desses microrganismos (GEADA *et al.*, 2017). Dentro do cloroplasto, as microalgas autotróficas são capazes de utilizar a radiação solar como energia para a oxidação da água, cujo próton e elétron liberados impulsionam uma série de reações de oxidação e redução nos fotossistemas II e I que culminam com a síntese de ATP, que, no ciclo de Calvin, é utilizada para fixação de CO_2 em açúcares (TAIZ & ZEIGER, 2002).

A maioria das microalgas é autotrófica, o que significa que necessitam apenas de luz, água, CO₂ e nutrientes inorgânicos para se desenvolverem. Entretanto, sabe-se que quantidades traço de compostos orgânicos (e.g. vitaminas) também são vitais para o crescimento desses microrganismos (GROBBELAAR, 2013). A maior parte dos estudos que exploram os potenciais biotecnológicos das microalgas são realizados com crescimento autotrófico, porém o potencial do crescimento heterotrófico de microalgas vêm sido resgatado e explorado. (WANG *et al.*, 2014).

3.2.3.3. Heterotrofia

As microalgas que crescem em modo heterotrófico utilizam compostos orgânicos tanto como fonte de energia quanto como fonte de carbono. Por ser independente da luz, o crescimento de microalgas em regime heterotrófico não possui as desvantagens relacionadas à fotolimitação, o que potencialmente faz com que os cultivos cheguem a concentrações celulares expressivamente maiores (WANG *et al.*, 2014). Entretanto, a necessidade de um suprimento constante de carbono orgânico (e.g. açúcares, acetatos, glicerol) faz com que cultivos heterotróficos sejam muito custosos (TABERNERO *et al.*, 2012), além de torná-los um prato cheio para contaminação com outros microrganismos heterotróficos, como bactérias e fungos. A heterotrofia geralmente é empregada em condições controladas quando se quer obter produtos de alto valor, como faz a empresa americana Martek ao cultivar a microalga *Cryptocodinium cohnii* em regime heterotrófico para produção de ácido docosaenoico (MENDES *et al.*, 2009).

3.2.3.4. Mixotrofia

Algumas microalgas são mixotróficas, o que significa que podem combinar a autotrofia com a heterotrofia, utilizando tanto compostos orgânicos quanto CO₂ para seu crescimento. Ambos os tipos de metabolismo (autotrófico e heterotrófico) ocorrem simultaneamente na mixotrofia, exceto sob condições de escuridão completa, onde a heterotrofia domina (GEADA *et al.*, 2017). Como mencionado, o crescimento de microalgas sob condições heterotróficas e mixotróficas é expressivamente maior quando comparado com o crescimento autotrófico, entretanto, os custos também o são, sendo que cerca de 80% do custo total é destinado para a aquisição do substrato orgânico (LI *et al.*, 2007). Portanto, a atenção tem se voltado para pesquisas com substratos alternativos de menor custo e que satisfaçam as necessidades nutricionais das microalgas, com o objetivo de tornar esses tipos de cultivos economicamente viáveis (WANG *et al.*, 2014).

Alguns pesquisadores sugerem que a taxa de crescimento de microalgas em regime de mixotrofia é aproximadamente igual à soma das taxas em autotrofia e heterotrofia (MARQUEZ *et al.*, 1993), enquanto outros discutem que a simples soma desses fatores não corresponde com a realidade, visto que a fotossíntese e a respiração aeróbia afetam uma à outra, o que pode resultar em efeitos sinérgicos que aumentam o crescimento (ACIÉN-FERNÁNDEZ *et al.*, 2013; YU *et al.*, 2009; VONSHAK *et al.*, 2000). Se comparado com o cultivo heterotrófico puro, cultivos mixotróficos de microalgas têm maior produtividade de biomassa, se ambos forem realizados com quantidades idênticas da mesma fonte de carbono orgânico (WANG *et al.*, 2014).

3.3. Cultivo de microalgas para produção de biomassa

O cultivo de biomassa microalgácea visando à produção de biomassa para aproveitamento energético tem sido o foco de diversos grupos de pesquisa nos últimos anos (MILANO *et al.*, 2016). Entretanto, apesar da expectativa que se encontra nesse setor, são muitas as variáveis que necessitam ser estudadas para aprimorar a produção desta biomassa, com o objetivo de tornar o processo financeira e energeticamente viável. De fato, os elevados custos para a produção de biomassa microalgácea seguem como uns dos principais desafios que impedem a aplicação destes sistemas em escala real. A viabilidade em curto a médio prazo da implantação de sistemas tradicionais de produção de microalgas se torna claramente questionável ao analisarmos seu balanço energético, uso de recursos e impactos ambientais sob a ótica da análise de ciclo de vida (COLLET *et al.*, 2013; SILLS *et al.*, 2013; CLARENS *et al.*, 2010).

Para melhorar a viabilidade de sistemas baseados em microalgas são necessários investimentos em pesquisas que visem à redução de custos em praticamente todas as etapas, da escolha do meio de cultivo e parâmetros operacionais até à forma de transformação da biomassa coletada (WANG *et al.*, 2014). Dentre outros fatores, o estudo detalhado da cinética de crescimento de diferentes microalgas é crucial para definir parâmetros que permitem a elaboração de modelos matemáticos, que são necessários para dar suporte à implementação dos sistemas.

3.3.1. Parâmetros cinéticos de crescimento

O crescimento pode ser interpretado como qualquer forma de incremento no número de células ou biomassa de um organismo ou população. No caso de microrganismos, para se calcular taxas relacionadas ao crescimento são necessários dados

sobre a variação temporal da concentração celular ou biomassa no cultivo em questão. Quando esta variação ocorre sobre uma porcentagem fixa a denominamos taxa específica de crescimento (μ ; d^{-1}), que pode ser obtida de acordo com a Equação 1:

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

onde X_1 e X_2 são a concentração celular (células mL^{-1}) ou de biomassa ($mg L^{-1}$) no início (t_1) e fim (t_2) da fase exponencial de crescimento, respectivamente (WOOD *et al.*, 2005). Para o cálculo da taxa, é essencial que esses dados estejam inseridos na fase exponencial do crescimento, dado que nessa fase o crescimento é constante. Alternativamente, uma parte dos pesquisadores opta por utilizar o modelo cinético de Verhulst, de acordo com a Equação 2:

$$\frac{\delta X_t}{\delta t} = \mu X_t \left[1 - \frac{X_t}{X_m} \right] \quad (2)$$

onde X_t é a concentração de biomassa no tempo t e X_m é a concentração máxima de biomassa que o cultivo em questão pode atingir em regime de batelada (VERHULST, 1838).

Se o objetivo do estudo é avaliar as taxas de crescimento de uma população de microalgas, a contagem do número de células ou a medição da biomassa devem ser preferencialmente realizadas, visto que são medidas diretas. Alternativamente, métodos indiretos como clorofila *a in vivo*, densidade ótica e produção de metabólitos podem ser empregados desde que apresentem correlação linear prévia, sob as mesmas condições, com concentração celular ou biomassa (WOOD *et al.*, 2005).

Dentre as medidas indiretas, a densidade ótica (DO) tem apresentado boa correlação com biomassa em muitos estudos sobre cultivo de microalgas, principalmente

nos comprimentos de onda com maior absorbância pelos pigmentos fotossintetizantes, que incluem as regiões próximas a 440, 680 e 750 nanômetros (MYERS *et al.*, 2013). Por outro lado, a medida da clorofila *a* não tem-se mostrado confiável como método indireto de crescimento, segundo Ramaraj e colaboradores (2013). Como medida adicional para incrementar a confiabilidade nos dados, a coleta de amostras diárias no mesmo horário com tolerância de ± 30 min é eficaz para se evitar dispersão de valores nas séries temporais (WOOD *et al.*, 2005).

3.3.2. Regimes de cultivo

3.3.2.1. Batelada

Existem diferentes regimes de crescimento que podem ser empregados no cultivo de microalgas, sendo os mais relevantes o cultivo em batelada, batelada alimentada e cultivo em regime contínuo (ANDRADE *et al.*, 2014). No cultivo em batelada, todos os nutrientes necessários para o crescimento são adicionados no meio antes de o cultivo começar, com exceção do carbono, que em cultivos fotoautotróficos geralmente é obtido da dissolução do CO₂ atmosférico. Portanto, nesse tipo de cultivo, o crescimento das microalgas eventualmente cessa devido à depleção do substrato limitante e/ou acúmulo de subprodutos inibidores do crescimento (GEADA *et al.*, 2017). As principais consequências causadas por essas variações que ocorrem ao longo do cultivo em batelada incluem: a variação da composição química da biomassa, desencadeada pelas mudanças nas razões entre os nutrientes; e diferentes fases de crescimento (I - lag ou de adaptação; II - log ou de crescimento exponencial; III - redução do crescimento ou transição; IV - estacionária ou de equilíbrio; e V - declínio ou morte celular), como pode-se observar na Figura 2.

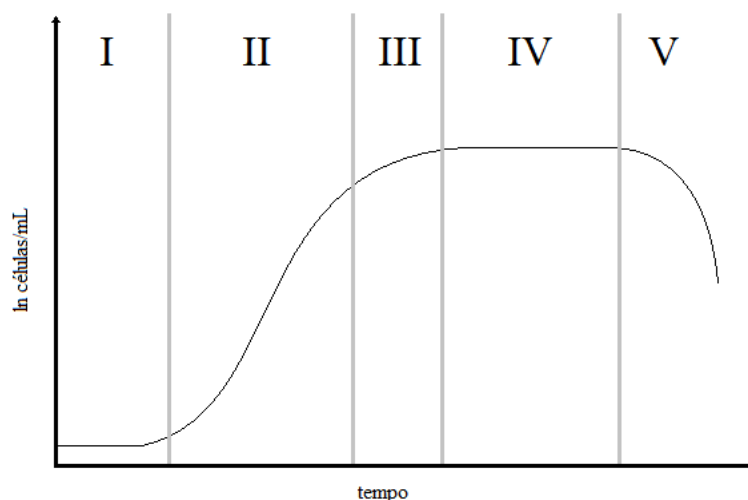


Figura 2. Curva típica de crescimento de microrganismos em regime de batelada, com tempo no eixo das abcissas e logaritmo natural da concentração celular no eixo das ordenadas. Numerais romanos representam: I – fase lag ou de adaptação; II – fase log ou de crescimento exponencial; III – fase de redução do crescimento ou transição; IV – fase estacionária ou de equilíbrio; e V – fase de declínio ou morte celular. **Fonte:** adaptado de Maier (2009).

A fase lag é caracterizada pela intensa atividade metabólica para produção de enzimas e síntese de DNA, que permitem a aclimação ao novo ambiente (BARSANTI & GUALTIERI, 2006). Entretanto, pouco dessa atividade metabólica é utilizada para o crescimento em si, visto que a energia nessa fase é direcionada à adaptação ao meio, desacelerando o crescimento para garantir a sobrevivência. Em cultivos de microalgas, a fase lag pode ser atenuada ou até eliminada, contanto que o inóculo seja obtido de uma cultura em fase exponencial de crescimento e as condições de cultivos sejam idênticas às dessa cultura. A segunda fase, denominada fase log ou de crescimento exponencial, é caracterizada por um aumento da taxa de crescimento, que atinge um valor constante por toda sua extensão. O metabolismo nessa fase é direcionado ao crescimento e multiplicação celular, que geralmente cessam quando há a depleção do substrato limitante (TORTORA *et al.*, 2006).

A terceira fase marca a redução do crescimento, que deixa de ser exponencial quando o estado fisiológico da população se torna desfavorável ao crescimento (RICHMOND, 2004). Na quarta fase, denominada fase estacionária ou de equilíbrio, a taxa de crescimento se iguala à taxa de morte celular, resultando em um platô na curva de crescimento, como pode-se observar na Figura 2. A quarta e última fase, de declínio ou morte celular, é caracterizada pelo aumento na taxa de morte celular, que supera a taxa de crescimento provocando um declínio na população.

Pode-se perceber que o cálculo da taxa de crescimento, por utilizar dados somente da fase exponencial, não considera as outras fases do crescimento em batelada. Portanto, para experimentos de cultivo com objetivo de produzir biomassa, há o parâmetro produtividade volumétrica de biomassa (PB; mg L⁻¹ d⁻¹), que é calculado segundo a Equação 3:

$$PB = \frac{X_f - X_i}{t_f - t_i} \quad (3)$$

onde X_i e X_f são, respectivamente, a concentração de biomassa nos tempos inicial (t_i) e final (t_f) do experimento, antes do declínio celular. É importante ressaltar que a maioria dos processos existentes de cultivo de microalgas em massa são baseados no regime de batelada, principalmente devido à sua simplicidade e menor risco de contaminação (GEADA *et al.*, 2017).

3.3.2.2. Batelada alimentada

O regime de batelada alimentada (*fed-batch*) é baseado na adição contínua ou descontínua de meio de cultura ou nutrientes ao cultivo em batelada, possibilitando a extensão da fase de crescimento exponencial e por consequência maior produtividade

volumétrica (CAMACHO *et al.*, 1990). Esse é o segundo tipo de cultivo mais utilizado em escala industrial (RICHMOND, 2004), principalmente para produção de metabólitos secundários. Diferentemente do cultivo em regime contínuo, o cultivo em batelada alimentada mantém as células e seus produtos dentro do biorreator, portanto a recuperação da biomassa tem que ser realizada periodicamente, no final de cada ciclo de cultivo. Isso faz com que esses sistemas tenham volume variável durante os ciclos, como pode-se observar na Figura 3. Alternativamente, pode-se adicionar nutrientes em solução altamente concentrada ao invés de meio de cultivo, prevenindo assim as variações de volume no sistema em batelada alimentada.

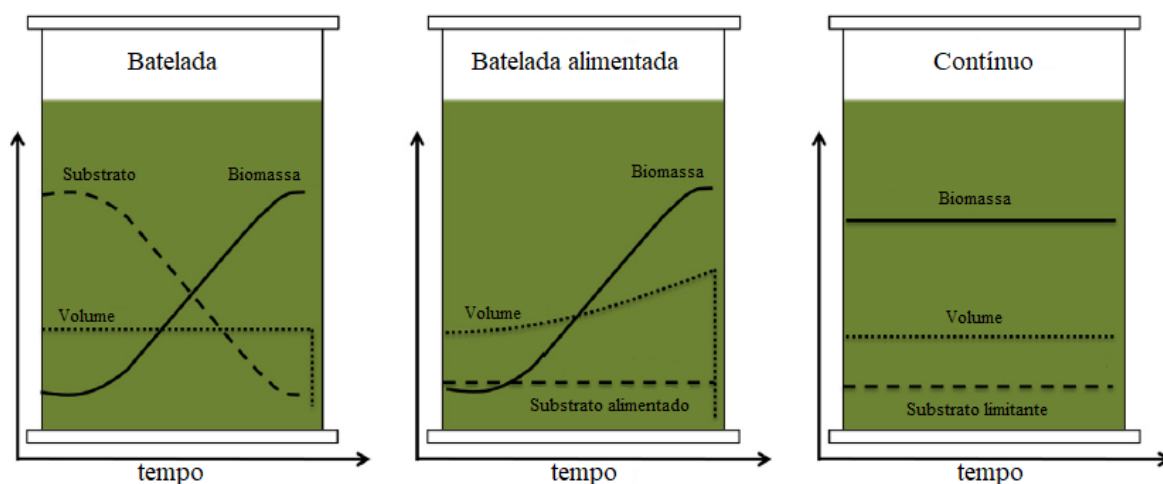


Figura 3. Variações gerais no volume, biomassa e concentração de substrato nos regimes de cultivo em batelada, batelada alimentada e contínuo.

Fonte: adaptado de Geada *et al.* (2017).

3.3.2.3. Contínuo

O regime contínuo de crescimento se consiste em uma contínua adição de meio de cultura ao biorreator, em uma vazão que deve ser igual à taxa de retirada, mantendo assim o volume constante (WOOD *et al.*, 2005). Ou seja: na entrada do sistema há meio de cultura fresco; no meio (biorreator) há a cultura de microalgas com concentração

celular, concentração de nutrientes e volume constantes; e na saída do sistema está a biomassa de microalgas associada à fase líquida, como pode-se observar no esquema da Figura 4. Nesse tipo de cultivo, as microalgas teoricamente se encontram em estado constante de crescimento exponencial, visto que a concentração dos substratos é constante, o que contribui para a atratividade econômica desse tipo de cultivo. Entretanto, esse crescimento exponencial *ad infinitum* não ocorre na realidade, mesmo em operações totalmente controladas, principalmente devido à processos relacionados ao envelhecimento celular (FERNANDES *et al.*, 2015). O que se obtém no regime contínuo é o chamado crescimento equilibrado (*steady-state growth*), que é um estado onde as concentrações de biomassa e nutrientes permanecem constantes dentro do biorreator. Esse estado pode ser mantido por muitas gerações, se bem operado.

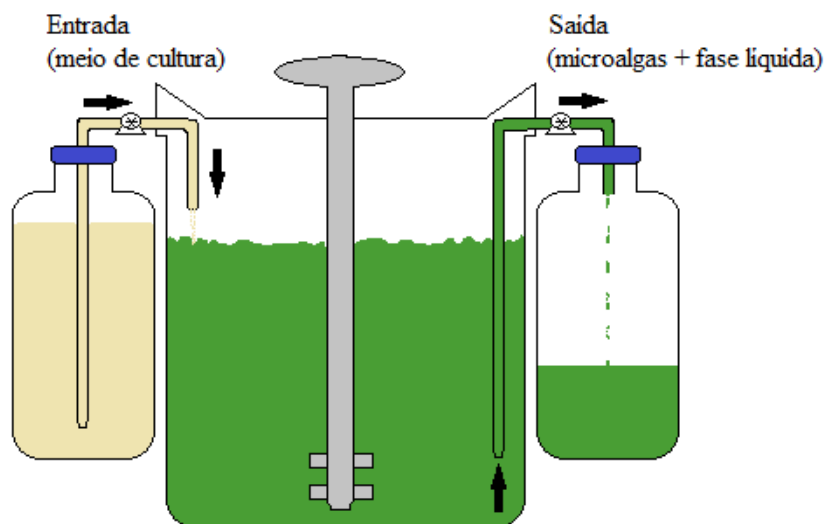


Figura 4. Esquema generalizado de um cultivo de microalgas em biorreator tipo quimiostato operando em regime contínuo de crescimento.

Fonte: autor.

Ao contrário dos cultivos em regime de batelada, nos sistemas em contínuo há um controle rigoroso das condições e do ambiente de cultivo, o que permite a obtenção de

biomassa com composição específica em uma taxa fixa de crescimento (ZHU & JIANG, 2008). Ademais, outras vantagens de se cultivar microalgas em regime contínuo incluem: maior produtividade volumétrica de biomassa; redução da área requerida para cultivo; menos força de trabalho e custos operacionais; e redução dos períodos de entressafra (FERNANDES *et al.*, 2015). Entretanto, o sistema contínuo exige um conhecimento mais detalhado sobre a cinética de crescimento da microalga em questão, visto que os parâmetros operacionais são escolhidos com base na taxa específica de crescimento, dentre outros fatores cinéticos. A produtividade volumétrica de biomassa em regimes contínuos (PB_D ; $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$) pode ser calculada de acordo com a Equação 4 (GRIFFITHS & HARRISON, 2009):

$$PB_D = X_D \times D \quad (4)$$

onde X_D é a concentração de biomassa dentro do biorreator operando sob determinada taxa de diluição (D ; d^{-1}). Destaca-se que a taxa de diluição é o inverso do tempo de detenção hidráulico (TDH; d), que por sua vez é o tempo que o líquido fica retido dentro do sistema.

Em um biorreator operando sob regime contínuo, em estado de crescimento equilibrado, ausência de microalgas no meio de cultura afluyente, e volume constante, é considerado que:

$$\mu = \frac{F}{V} = D \quad (5)$$

onde F é o fluxo volumétrico de entrada do meio de cultura, V é o volume útil do biorreator e D a taxa de diluição (WOOD *et al.*, 2005). Nessa equação (Equação 5) a taxa de morte celular (m) é desconsiderada devido à sua pequenez frente à taxa de crescimento (μ). Se a taxa de diluição for maior que a taxa máxima de crescimento ($D > \mu_{\text{máx}}$), a

concentração de biomassa vai tender a zero devido à lavagem (*washout*) do biorreator. Portanto, a taxa de diluição não deve ser maior do que a taxa máxima de crescimento da microalga que se está cultivando.

Em cultivos contínuos de microalgas, a produtividade máxima de biomassa geralmente ocorre com densidades celulares elevadas, ao passo que a taxa máxima ($\mu_{\text{máx}}$) acontece em baixas densidades (RICHMOND, 2013). Por conseguinte, o conceito de concentração celular ótima é aplicável, dependendo do objetivo do cultivo. Para produção de biomassa – sendo a biomassa o objetivo – opta-se pela produtividade máxima, portanto a taxa de diluição deve ser baseada não na taxa máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$), mas em aproximadamente 50 % do seu valor (MYERS & GRAHAM, 1959; RUIZ *et al.*, 2013). Segundo Fernandes e colaboradores (2015), a produtividade em regime contínuo é de 2,3 a 5 vezes maior que a produtividade em regime de batelada. Entretanto, o regime de cultivo em batelada ainda é o mais utilizado para processos de produção de microalgas em massa, devido principalmente à resistência gerada pelos gargalos tecnoeconômicos do cultivo contínuo, bem como à falta de estudos de caso de sucesso (GEADA *et al.*, 2017).

3.3.3. Fatores relevantes para o cultivo

3.3.3.1. Luminosidade e temperatura

A luminosidade é essencial para a fotossíntese, e em cultivos é medida tanto por sua intensidade do fluxo de fótons quanto pela periodicidade da fase luminosa (fotoperíodo). Uma das limitações do cultivo fotoautotrófico é a produtividade de biomassa, que por depender intimamente da luz, é prejudicada em situações com elevada densidade celular devido ao fenômeno do auto-sombreamento (BOROWITZKA, 1998).

Por outro lado, a luminosidade excessiva também prejudica a fotossíntese, forçando as microalgas a dissipar os fótons para prevenir danos aos fotossistemas (TAIZ & ZEIGER, 2002). Por conseguinte a luminosidade é um dos fatores que mais afetam os cultivos fotoautotróficos de microalgas, e tanto a falta quanto o excesso desta são deletérios para a produtividade, mesmo em condições ótimas de nutrientes. Em qualquer momento, a quantidade de luz que será aproveitada para fotossíntese em um cultivo dependerá do grau de atenuação que a luz sofre ao passar pela coluna d'água e da densidade celular do cultivo (SUTHERLAND *et al.*, 2015). Segundo Borowitzka (1998), em condições de altas densidades celulares, aproximadamente um terço das microalgas não recebe luminosidade suficiente para ter benefício líquido no processo de fotossíntese.

Sob condições limitantes de luminosidade cada célula tende a aumentar sua concentração de pigmentos a fim de captar mais luz, o que pode levar a um auto-sombreamento intracelular denominado “efeito pacote” (*package effect*) (WILHELM & JAKOB, 2011). As estratégias mais comumente adotadas para atenuar o auto-sombreamento e o efeito pacote são a redução da profundidade dos biorreatores e o emprego de agitadores, que podem ser mecânicos ou através da aeração (SUTHERLAND *et al.*, 2015). Outro fator que pode modificar a concentração de clorofila, e por consequência a captação de luz, é a temperatura que, segundo Kumar e colaboradores (2010), deve permanecer entre 20 e 30 °C nos cultivos de espécies tropicais. Valores próximos a 27 °C parecem ser mais adequados para produção de biomassa, visto que temperaturas baixas reduzem a velocidade das reações metabólicas e temperaturas mais elevadas podem aumentar rapidamente a taxa de fotorrespiração causando declínio nas culturas (BOROWITZKA, 1998).

3.3.3.2. Agitação

O processo de agitação em cultivos de microalgas fornece uma série de benefícios, como: melhorar a eficiência de utilização da luz; favorecer as trocas gasosas, reduzindo os efeitos de fotorrespiração; impedir a estratificação térmica; e auxiliar na distribuição homogênea dos componentes do meio (RICHMOND, 2004). Esses fatores influenciam a produtividade de biomassa, sendo essenciais para a obtenção de condições ótimas de cultivo (SUH & LEE, 2003).

Cultivos em escala de bancada geralmente utilizam agitadores magnéticos para a mistura, ou a promovem através da aeração, com ar atmosférico puro ou enriquecido com CO₂. Já nos cultivos em grande escala, a mistura pode ser realizada de diversas maneiras, que dependem da estrutura do sistema. Em tanques pequenos cobertos, a mistura geralmente é realizada através da aeração com compressores, enquanto que em tanques maiores, a aeração é insuficiente para promover a mistura, que é realizada com pás rotativas ou recirculação do cultivo (COSTA *et al.*, 2014). A maioria das espécies de microalgas se beneficiam com a agitação, entretanto, o excesso desta pode ser deletério para o cultivo.

3.3.3.3. pH e disponibilidade de carbono inorgânico

A principal fonte de carbono inorgânico para crescimento de microalgas fotoautotróficas é o gás carbônico (CO₂), que em meio aquoso pode se encontrar na forma de CO₂, ácido carbônico (H₂CO₃), bicarbonato (HCO₃⁻) ou carbonato (CO₃²⁻). As proporções destas diferentes espécies em solução aquosa é pH-dependente, como pode-se observar na Figura 5.

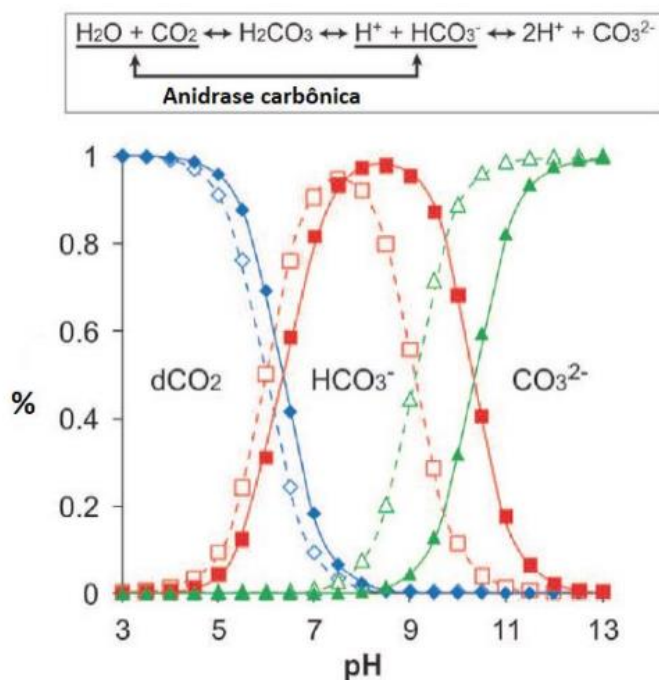


Figura 5. Equilíbrio das espécies de carbono inorgânico dissolvido em água doce e salgada a 25°C. Água doce é representada pela linha sólida com $pK_{a1} = 6.35$ e $pK_{a2} = 10.33$. Água salgada é representada pela linha tracejada com $pK_{a1} = 6.00$ e $pK_{a2} = 9.10$. A cor azul representa dCO_2 ; vermelho HCO_3^- ; e verde CO_3^{2-} .

Fonte: adaptado de Baba & Shiraiwa (2007).

Dentre essas espécies químicas em meio aquoso, as formas CO_2 e HCO_3^- são as preferencialmente assimiladas nas rotas fisiológicas das microalgas (BABA & SHIRAIWA, 2007). Isso implica que o crescimento pode se tornar limitado em valores de pH maiores que 10,4 pois o carbono inorgânico se encontrará predominantemente na forma de carbonato, o qual muitas microalgas não conseguem assimilar (BOROWITZKA, 1998). Aumentos de pH são muito comuns em cultivos fotoautotróficos devido à fotossíntese e à respiração celular. Em cultivos fotoautotróficos as microalgas utilizam gás carbônico (CO_2) e íons H^+ do meio para realizar a fotossíntese, logo, o decréscimo na concentração de H^+ leva ao aumento do pH como consequência da atividade fotossintética (CHI *et al.*, 2011). Na ausência de luz ocorre a respiração celular, onde há liberação de CO_2 para o meio e formação de bicarbonatos e H^+ , ocasionando uma queda de pH durante o período noturno.

Portanto o controle do pH nas culturas de microalgas contribui para elevar a assimilação de carbono inorgânico, aumentando por consequência a produtividade de biomassa. As maneiras mais usadas de controle de pH incluem: o borbulhamento dos cultivos com CO₂, de maneira contínua ou em resposta ao aumento de pH; tamponamento do meio; e adição de ácidos orgânicos (e.g. ácido acético) ou inorgânicos em resposta ao aumento do pH (COSTA *et al.*, 2014).

Ao longo da evolução das microalgas estas desenvolveram mecanismos de concentração de carbono que envolvem a enzima anidrase carbônica (AC). Esta enzima é responsável por catalisar a reação de transformação de CO₂ em HCO₃⁻, como pode-se observar na parte superior da Figura 5. A ação da AC permite o acúmulo de carbono inorgânico dentro do cloroplasto, elevando as taxas de captura do carbono pela ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (RuBisCO) e consequentemente a fixação de carbono (BABA & SHIRAIWA, 2007). Ainda, a enzima AC evita que o CO₂ absorvido pela célula seja perdido via difusão pela membrana celular do cloroplasto, considerando que esta possui alta permeabilidade ao CO₂. A conversão de CO₂ em HCO₃⁻ pode ser realizada pela AC dentro do cloroplasto de acordo com a demanda (CHI *et al.*, 2011).

Apesar das microalgas possuírem mecanismos de concentração de carbono, elas ainda necessitam de 1,8 a 2,0 kg de CO₂ para formar 1,0 kg de biomassa, aproximadamente (CHISTI, 2007). Segundo Klein e colaboradores (2018), a quantidade de CO₂ presente na atmosfera (0,04% v/v; NOAA, 2018) não é suficiente para propiciar uma alta produtividade em cultivos, visto que a velocidade das trocas gasosas do meio líquido com a atmosfera não permitem a obtenção de taxas máximas de crescimento e produtividade no cultivo de microalgas. Portanto, a comunidade científica pressupõe que há a necessidade de borbulhamento de gás enriquecido com CO₂ em todos os cultivos focados em biomassa. Entretanto, sabe-se que maioria do CO₂ oferecido aos cultivos

dessa maneira não são aproveitados pelas microalgas e acabam se desprendendo para a atmosfera (MEIER *et al.*, 2017). Ademais, altas concentrações de CO₂ são prejudiciais, pois inibem a ação da AC e consequentemente dos mecanismos de concentração de carbono (HUSSAIN *et al.*, 2017).

Muitos estudos sobre cultivo de microalgas utilizam e recomendam o borbulhamento de gás enriquecido com CO₂ em uma concentração de 1 a 10 % (v/v) (HUSSAIN *et al.*, 2017; NAYAK *et al.*, 2016; GONÇALVES *et al.*, 2016a). Entretanto, algumas recomendações parecem ser arbitrárias, visto que estudos sobre a concentração ótima para cada espécie são escassos, além de não abordarem o problema do desprendimento de CO₂ para a atmosfera (YUVRAJ & PADMANABHAN, 2017). Para abordar a sustentabilidade nas práticas de suplementação de carbono, fontes alternativas como gases de combustão, biogás ou até formas sólidas como NaHCO₃ e CaCO₃ já foram aplicadas com sucesso em cultivos (MEIER *et al.*, 2017; PANCHAL *et al.*, 2015). De uma maneira geral, a suplementação com carbono inorgânico resulta em aumento da produtividade, porém há muitos estudos onde o aumento não é tão expressivo (< 30%) (PARK *et al.*, 2011; GODOS *et al.*, 2010) ou até ausente (POSADAS *et al.*, 2015; KONG *et al.*, 2010).

3.3.3.4. Nutrientes

Além de afetar negativamente a assimilação de carbono, o aumento no pH das culturas também pode influenciar a concentração de nutrientes no meio, visto que condições de alto pH (> 9,5) e temperatura (> 25 °C) resultam na dissociação do íon amônio (NH₄⁺) em amônia livre (NH₃), que dificilmente é assimilável. Por ser gasosa, parte da amônia livre se desprende da fase líquida, entretanto, a parte que se dissolve pode reduzir taxas fotossintéticas em até 90%, devido à sua toxicidade para microalgas (AZOV

& GOLDMAN, 1982). O aumento do pH, juntamente com a presença de alguns cátions metálicos bivalentes (e.g. Ca^{2+}) também pode estimular a precipitação do fósforo na forma de sais insolúveis, contribuindo para reduzir a concentração de fósforo biodisponível (CAI *et al.*, 2013).

Isso pode afetar a razão de nutrientes em um cultivo, pois microalgas absorvem, proporcionalmente à sua necessidade, mais fósforo que nitrogênio, em condições não limitantes de carbono (REDFIELD, 1958). De acordo com Rogers e colaboradores (2014), a concentração de macronutrientes em um cultivo de microalgas deve refletir a canônica razão de Redfield de $\text{C}_{106}\text{H}_{181}\text{O}_{45}\text{N}_{16}\text{P}$. Entretanto, a razão molar N:P de 16:1 não parece ser condição *sine qua non* para muitas espécies de microalgas, visto que esta pode variar de 5:1 a 20:1 sem aparentemente afetar a produtividade desses cultivos (GEIDER & LA ROCHE, 2002). Razões N:P altas parecem ser mais prejudiciais ao cultivo do que razões menores, o que significa que o fósforo é, por muitas vezes, o elemento limitante para cultivos de microalgas, considerando que o carbono não o seja.

O cultivo de microalgas é realizado tradicionalmente com meios de cultivo artificiais, que são soluções líquidas com todos os componentes químicos necessários para o desenvolvimento da microalga em questão, como macro, micronutrientes e vitaminas. Entretanto, não há um só meio de cultivo que seja viável para o cultivo de todas as espécies de microalgas, visto que cada uma tem requerimentos específicos (COSTA *et al.*, 2014). Exemplos dos meios de cultivo mais utilizados incluem: Zarrouk (ZARROUK, 1966); Paoletti (FERRAZ *et al.*, 1985); Chu (CHU, 1942); BBM (STOKES *et al.*, 1973); BG-11 (ALLEN, 1968); ou modificações destes. Entretanto, meios alternativos como efluentes de sistemas de tratamento de esgoto também podem ser utilizados, contanto que tenham as características físico-químicas e microbiológicas propícias ao crescimento da microalga em questão (ARITA *et al.*, 2015).

3.3.3.5. Interações com outros microrganismos

Tradicionalmente os cultivos de microalgas são monoalgáceos, o que significa que são compostos por apenas uma espécie, em um meio de cultivo específico para esta. Sob essa ótica, a presença de outros microrganismos nos cultivos é interpretada como contaminação e, levando em conta os possíveis efeitos deletérios da competição interespecífica, muitos esforços são despendidos para manter os cultivos puros (VU *et al.*, 2018). Entretanto, atualmente é reconhecido que algumas interações entre microalgas e outros microrganismos têm potencial tanto para aumentar a produtividade quanto para enriquecer a biomassa microalgácea com compostos de interesse comercial, como lipídeos e carboidratos (FUENTES *et al.*, 2016). Porém, cabe ressaltar que nem todas as interações interespecíficas em cultivos de microalgas têm potencial positivo.

Algumas comunidades de bactérias, ao se associarem com microalgas, podem ser úteis para incrementar o crescimento das últimas através da secreção de vitaminas essenciais (CROFT *et al.*, 2005), reduzindo assim os custos para produção de biomassa. De fato, a maior parte das microalgas necessita de um suprimento externo de determinadas vitaminas, visto que não tem a capacidade de produzi-las. A vitamina B12 é uma delas, sendo um cofator necessário para o funcionamento da enzima metionina sintase. Essas interações não são apenas benéficas para as microalgas, visto que as bactérias também recebem oxigênio e carbono orgânico secretado pelas microalgas, como esquematizado na Figura 6.

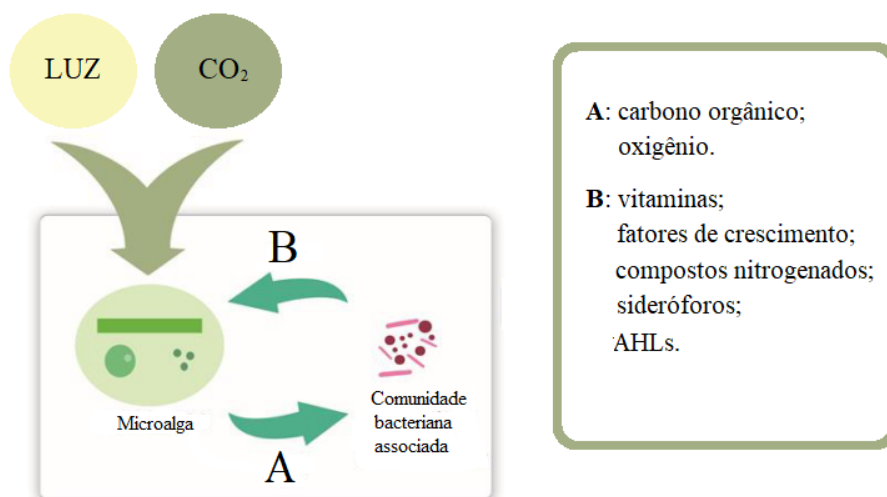


Figura 6. Interações mutualísticas entre microalgas e comunidades bacterianas associadas. “A” representa as moléculas que as microalgas produzem e as bactérias utilizam, como O_2 e compostos orgânicos. “B” representa as moléculas produzidas pelas bactérias e utilizadas pelas microalgas, que incluem: vitaminas essenciais; fatores de crescimento (e.g. ácido indolacético – AIA); compostos nitrogenados (excretados pelas bactérias ou fixados); sideróforos (moléculas orgânicas que formam ligações com o ferro, solubilizando-o e tornando-o biodisponível); e n-acil homoserina lactonas (AHLs), que são mensageiros químicos do mecanismo de *quorum sensing*.

Fonte: adaptado de Fuentes *et al.* (2016).

Essas interações ocorrem praticamente em todos os ambientes naturais onde há microalgas (CROFT *et al.*, 2005). Tais relações podem ser estudadas e até replicadas em sistemas de cultivo de biomassa microalgácea, formando um ambiente que propicia maior produtividade e assimilação de macro e micronutrientes, além de ser menos suscetível à contaminação com microrganismos indesejáveis (PADMAPERUMA *et al.*, 2018). Entretanto, estudos sobre a aplicação dessas interações em cultivos são escassos (RASHID *et al.*, 2018), e, devido à especificidade das relações e à quantidade de espécies de microalgas e bactérias que existem, muitas pesquisas ainda são necessárias para desenvolver esse potencial e aplicá-lo em escala real.

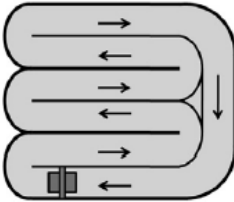
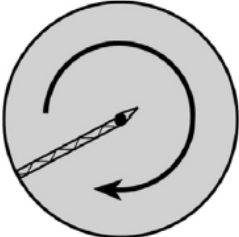
Consórcios de microalgas com bactérias e com outros microrganismos também ocorrem naturalmente em lagoas de estabilização, entretanto o foco nesse caso é o polimento do efluente. O uso de consórcios para produção de biomassa ou metabólitos de

interesse é uma área nova, e foi aplicada com sucesso por Choix e colaboradores (2012), que notaram um aumento na produtividade e na concentração de carboidratos de *Chlorella* sp. quando cultivada juntamente com a bactéria *Azospirillum brasiliense*, já conhecida por promover o crescimento em plantas. Ademais, a fixação de nitrogênio em condições aeróbias por bactérias fixadoras como *Azotobacter vinelandii* pode resultar em um aumento no suprimento de nitrogênio inorgânico para o crescimento das microalgas em cultivo conjunto, como demonstrado no clássico experimento de Lipman e Teakle (1925) e mais recentemente por Villa e demais autores (2014).

3.3.4. Reatores para produção de biomassa

A estratégia mais utilizada para produção de biomassa de microalgas é o cultivo em fotobiorreatores (FBRs), que podem ser classificados de acordo com suas características físicas como sistemas abertos ou fechados (SOUTO *et al.*, 2014). Os sistemas abertos são mais adequados para grande escala, pois são mais simples, custam menos e são mais fáceis de operar, além de assegurarem a incidência de luz através da profundidade rasa. Os sistemas abertos como lagoas de alta taxa já são utilizados desde os anos cinquenta (OSWALD & GOTAAS, 1958), e exemplos incluem as lagoas circulares e as lagoas tipo “pista de corrida” (*raceway*), como pode-se observar na Tabela 6. Nessa tabela, as vantagens e limitações desse tipo de sistema também são abordadas.

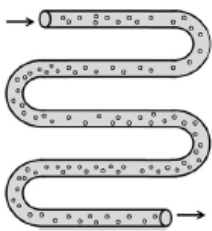
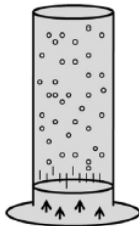
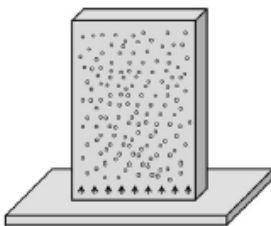
Tabela 6. Vantagens e limitações dos sistemas abertos de cultivo de microalgas.

Sistemas abertos	Vantagens	Limitações
Exemplos:		
-Lagoa do tipo “pista de corrida”	-Custos relativamente baixos	-Pouco controle sobre os parâmetros da cultura
	-Fácil manutenção e limpeza	-Ineficiência no aproveitamento de luz e CO ₂
	-Baixo consumo de energia	-Dificuldade de manutenção prolongada das culturas
-Lagoa circular		-Mistura ineficiente
		-Baixas produtividades de biomassa
		-Alto risco de contaminação
		-Suscetibilidade à chuva (diluição) e evaporação

Fonte: adaptado de Brennan & Owende (2010).

Espécies como *Chlorella* sp. são cultivadas em massa no continente asiático com sistemas de lagoas circulares, principalmente para produção de suplementos alimentares humanos ou rações para peixes. Entretanto a maior instalação do mundo (440.000 m²; cultivo de *Spirulina* sp.) fica na Califórnia (EUA) e é baseada inteiramente em lagoas do tipo “pista de corrida” (GEADA *et al.*, 2017). A escolha da espécie para cultivos abertos é sempre baseada na robustez, rápido crescimento e resiliência da microalga em questão, visto que as fontes constantes de contaminação biológica no ar impedem a manutenção de culturas axênicas. Esse fato estimulou engenheiros a conceberem os sistemas fechados de cultivo, que são mais controláveis e menos suscetíveis à contaminação. Algumas vantagens e limitações dos principais tipos de sistemas fechados para o cultivo de microalgas são abordadas na Tabela 7.

Tabela 7. Vantagens e limitações dos sistemas fechados de cultivo de microalgas.

Sistemas fechados	Vantagens	Limitações
FBRs tubulares 	<ul style="list-style-type: none"> -Razoavelmente econômico -Ótima superfície de iluminação -Adequado para cultivos em lugares abertos -Alta produtividade de biomassa 	<ul style="list-style-type: none"> -Gradiente de pH, O₂ e CO₂ dissolvidos ao longo dos tubos -Formação de biofilme nas paredes internas -Risco de fotoinibição
FBRs em colunas 	<ul style="list-style-type: none"> -Baixo consumo de energia -Boa mistura e transferência de massa -Baixa tensão de cisalhamento -Potencial para escalonamento -Fácil esterilização 	<ul style="list-style-type: none"> -Auto-sombreamento em densidades celulares elevadas -Materiais caros e construção sofisticada -Escalonamento piora o aproveitamento da luminosidade
FBRs em painéis 	<ul style="list-style-type: none"> -Relativamente barato -Fácil limpeza -Boa superfície de iluminação -Redução no consumo de energia -Alta produtividade de biomassa -Baixo acúmulo de O₂ 	<ul style="list-style-type: none"> -Dificuldade no escalonamento -Formação de biofilme nas paredes internas -Estresse hidrodinâmico para algumas espécies de microalgas

Fonte: adaptado de Brennan & Owende (2010).

3.4. Cultivo de microalgas em efluentes

Nos últimos anos, tem-se observado um interesse crescente no reaproveitamento dos recursos contidos em muitos tipos de resíduos, incluindo efluentes de ETEs. Processos biotecnológicos, como o cultivo de microalgas em efluentes, oferecem um potencial real para o desenvolvimento de sistemas que confluam na economia biobaseada (PUYOL *et al.*, 2016). Além de ser eficaz na remoção de nutrientes, o cultivo de biomassa microalgácea em efluentes contribui para a implantação do conceito de resíduo zero na produção de biocombustíveis, uma vez que reduz, ou mesmo elimina, a utilização de

fertilizantes químicos (CHEN *et al.* 2015). Ademais, a pegada hídrica do processo também pode ser reduzida em até 90% (YANG *et al.*, 2011), considerando que no cultivo o consumo de água seria devido apenas às perdas por evaporação. Ainda, a produção de água de reuso para aplicações menos nobres é uma possibilidade desses sistemas.

3.4.1. Produção de biomassa

Tipicamente, a composição dos efluentes de tratamento de esgotos domésticos satisfazem as necessidades nutricionais para crescimento das microalgas, assim como a água necessária para o cultivo (GULDHE *et al.*, 2017). Ademais, as produtividades que se podem atingir com esses tipos de meios são comparáveis às de cultivos em meio sintético, sendo um indício das vantagens dessa integração de processos. Diversos tipos de efluentes já foram aplicados para a produção de biomassa microalgácea, como pode-se observar na Tabela 8.

A composição bioquímica da biomassa é bem variável nesses tipos de cultivo, entretanto Ruiz e colaboradores (2013) cultivaram *Scenedesmus* sp. em efluente secundário em regime contínuo e atingiram uma concentração de 20 a 30% de lipídeos na biomassa seca, dependendo da TDH aplicada. Ainda, lograram um controle sob essa composição – TDHs maiores estimularam o aumento na concentração de lipídeos, como é de se esperar em cultivos sob estresse nutricional. Já Jebali e demais autores (2015) não observaram diferenças na concentração de lipídeos da biomassa (15%) ao cultivarem *Scenedesmus* sp. em esgoto doméstico filtrado em regime semi-contínuo com diferentes TDHs.

Tabela 8. Exemplos de produtividades de biomassa e tipos de efluentes de ETEs utilizados para o cultivo de microalgas em fotobiorreatores.

Meio de cultivo	Fotobiorreator (FBR) / Regime de cultivo	Táxon	Produtividade de biomassa (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	Referência
Esgoto doméstico filtrado	FBR em coluna/ Batelada alimentada	<i>Scenedesmus</i> sp.	900	Jebali <i>et al.</i> (2015)
Esgoto doméstico pré-tratado	FBR em coluna/ Batelada	<i>Chlorella vulgaris</i>	99	Mennaa <i>et al.</i> (2015)
Esgoto doméstico filtrado e autoclavado	FBR piloto em placa/ Batelada	“Bloom” natural	320	Mahapatra <i>et al.</i> (2014)
Efluente secundário filtrado	FBR em coluna/ Batelada alimentada	<i>Chlorella</i> sp.	400	Gómez-Serrano <i>et al.</i> (2015)
Efluente secundário de lodos ativados	FBR piloto em placa/ Contínuo	<i>Scenedesmus obliquus</i>	380	Ruiz <i>et al.</i> (2013)
Efluente secundário autoclavado	FBR Brite-Box/ Contínuo	<i>Scenedesmus</i> sp.	267	McGinn <i>et al.</i> (2012)
Efluente secundário desinfetado com UV	Erlenmeyers/ Batelada	<i>Chlorella</i> sp.	41	Cho <i>et al.</i> (2011)
Efluente secundário filtrado e autoclavado	FBR em coluna/ Batelada	<i>Neochloris oleoabundans</i>	233	Wang e Lan (2011)
Efluente de desaguamento de lodo	Erlenmeyers/ Batelada	<i>Chlorella sorokoniana</i>	187	Zhou <i>et al.</i> (2011)
Efluente esterilizado de desaguamento de lodo	FBR tubular piloto/ Batelada alimentada	<i>Chlorella</i> sp.	920	Li <i>et al.</i> (2011)
Meio sintético CHU modificado	Erlenmeyers/ Batelada	<i>Chlorella vulgaris</i>	324	Nascimento <i>et al.</i> (2015)
Efluente sintético	FBR tubular piloto/ Batelada alimentada	<i>Chlorella vulgaris</i>	147	Feng <i>et al.</i> (2011)

3.4.2. Remoção de nutrientes

Além da produção de biomassa com potencial para transformação em bioenergia, cultivos de microalgas são capazes de remover nutrientes da fase líquida do efluente, tornando-se um tipo de tratamento terciário (ABDEL-RAOUF *et al.*, 2014). A remoção

de nitrogênio e fósforo da fase líquida pode ocorrer basicamente de duas formas – direta ou indiretamente. Para o nitrogênio, a forma direta inclui a assimilação das formas inorgânicas desse elemento pelas microalgas, que o utilizam para seu crescimento. Por outro lado, o nitrogênio pode ser removido indiretamente, através da volatilização da amônia devido ao aumento de pH desencadeado pela fotossíntese, como explicado anteriormente. A assimilação do fósforo também pode ser direta, para o crescimento e metabolismo, ou indireta, através da precipitação desse elemento em condições de pH elevado. A eficiência de remoção (ER; %) de nutrientes em cultivos pode ser calculada de acordo com a Equação 6:

$$ER = \frac{S_i - S_f}{S_i} \times 100 \quad (6)$$

onde S_i representa a concentração do nutriente em questão na fase líquida do início do cultivo e S_f representa a concentração no final.

De uma maneira geral, as microalgas são eficazes na remoção desses dois elementos em efluentes, com eficiências que variam de 80 a 100% em muitos estudos (ARIAS *et al.*, 2018; PASSOS *et al.*, 2017; LEE *et al.*, 2016; SUKAČOVÁ *et al.*, 2015; MENNA *et al.*, 2015; JEBALI *et al.*, 2015; GÓMEZ-SERRANO *et al.*, 2015; RUIZ *et al.*, 2013). Um dos fatores operacionais que mais afetam a remoção de nutrientes em cultivos contínuos é o TDH, considerando que o prolongamento deste, até certo ponto, promove uma maior eficiência de remoção (ER) devido ao maior tempo de contato entre as microalgas e o meio (remoção direta), e do meio com as condições elevadas de pH (remoção indireta). Entretanto, TDHs menores resultam em maior remoção da quantidades de nutrientes, apesar de terem uma eficiência de remoção menor. Isso ocorre porque tratam um volume maior de efluente, portanto mesmo tendo uma eficiência (ER;

%) menor, podem possuir uma taxa de remoção de nutrientes (TR; mg L⁻¹ d⁻¹) mais elevada. Essa taxa pode ser calculada de acordo com a Equação 7:

$$TR = \frac{S_i - S_D}{HRT} \quad (7)$$

onde S_i é a concentração inicial do nutriente em questão no meio, S_D é a concentração do nutriente na fase líquida de um cultivo contínuo com taxa de diluição D e estado de crescimento equilibrado, e TDH é o tempo de detenção hidráulico.

Se comparados com processos tradicionais de remoção avançada de nutrientes (e.g. Bardenpho, Anammox, CANON), cultivos de microalgas têm um custo expressivamente menor de implantação, incluindo menores despesas com energia, manutenção e operação (SRIRAM & SEENIVASAN, 2012). Além de removerem nutrientes eficientemente sem necessitar de produtos químicos adicionais, cultivos de microalgas em efluentes possuem os benefícios suplementares de removerem metais pesados (GAUR & RAI, 2001), contaminantes farmacêuticos (XIONG *et al.*, 2018), e microrganismos patogênicos (GUTIÉRREZ-ALFARO *et al.*, 2018; POSADAS *et al.*, 2015).

3.4.3. Remoção ou inativação de microrganismos patogênicos

Esgotos domésticos e efluentes de ETEs geralmente possuem uma miríade de organismos patogênicos em sua composição (CHERNICHARO *et al.*, 2001). Se o objetivo adicional do tratamento for o reuso da água ao invés do lançamento, tais patógenos devem ser eliminados ou reduzidos de acordo com a legislação e regulamentos vigentes, o que tradicionalmente requer tratamentos como cloração ou ozonização. Entretanto, cultivos de microalgas em efluentes também são capazes de inativar ou

remover microrganismos patogênicos destes, através de basicamente seis possíveis mecanismos: I – adsorção dos microrganismos à superfície celular das microalgas; II – concentrações de O₂ elevadas, que mantêm o ambiente desfavorável para os patógenos; III – elevação e variação do pH, afetando o funcionamento de enzimas bacterianas; IV – produção de exotoxinas, que são tóxicas para alguns organismos incluindo coliformes; V – radiação solar UV, dado que o cultivo seja otimizado para captar eficientemente essa radiação; e VI – depleção de nutrientes e carbono orgânico do meio, necessários para o desenvolvimento e metabolismo dos patógenos (GUTIÉRREZ-ALFARO *et al.*, 2018; LEE *et al.*, 2015; UNNITHAN *et al.*, 2014; CRAGGS *et al.*, 2004; FALLOWFIELD *et al.*, 1996).

Gutiérrez-Alfaro e colaboradores (2018) observaram reduções em até 2 unidades logarítmicas na concentração de *Escherichia coli* em lagoas de alta taxa (LAT) do tipo pista de corrida tratando efluente secundário, e o mesmo valor foi encontrado por Craggs e demais autores (2004) para uma LAT do mesmo tipo tratando esgoto sintético. Já Fallowfield e colaboradores (1996) atingiram uma constante de decaimento (k_d) de 2,34 d⁻¹ em LATs com 15 a 30 cm de profundidade tratando esgoto sintético suplementado com acetato. De uma maneira geral, cultivos de microalgas em efluentes reduzem expressivamente a concentração de microrganismos indicadores de contaminação. Entretanto, os mecanismos teorizados para explicar essa redução necessitam ser mais aprofundados, a fim de incorporá-los em modelos matemáticos oferecendo um maior suporte para a aplicação dessas tecnologias (UNNITHAN *et al.*, 2014).

3.4.4. Desafios de cultivos em efluentes e estratégias para superá-los

O cultivo de microalgas em efluentes de ETEs traz uma série de benefícios como os abordados nas seções anteriores, entretanto há também uma série de desafios atrelados à essa forma de cultivo. O desafio mais aparente talvez sejam os meios em si (efluentes), que possuem composição físico-química e microbiológica complexas e variáveis de acordo com o nível de tratamento, as estações do ano, e hábitos das populações locais, dentre outros. Essas variações dificultam a estabilidade do processo, e simples mudanças na composição dos efluentes, como aumento da turbidez, alteração da razão de nutrientes, ou aumento da concentração de microrganismos nocivos às microalgas, podem levar o cultivo ao colapso (CAI *et al.*, 2013). Ademais, variações ambientais na temperatura e luminosidade marcam uma visível distinção entre experimentos em laboratórios e cultivos ao ar livre, portanto cautela é necessária ao fazer extrapolações de escala de bancada.

Em relação à composição físico-química, esgotos sanitários brutos geralmente não são adequados para o cultivo de microalgas devido à alta turbidez provocada por sólidos em suspensão, diminuindo assim o aproveitamento da luz. Além disso, as altas concentrações de carbono orgânico fazem com que o cultivo seja propício para o crescimento da comunidade heterotrófica em detrimento das microalgas. Entretanto, Mennaa e demais autores (2015) cultivaram diversas espécies de microalgas em esgoto doméstico pré-tratado e obtiveram resultados de produtividade consistentes, demonstrando que tratamentos preliminares podem tornar o esgoto bruto um meio adequado de crescimento. Por outro lado, Jebali e demais autores (2015) e Cho e colaboradores (2013) tiveram que filtrar seus esgotos pré-tratados para torná-los cultiváveis para as espécies utilizadas, enquanto que Mahapatra e outros (2014) tiveram que esterilizá-lo com uma autoclave.

A esterilização do efluente através da autoclavagem, apesar de ser custosa e impraticável em escala real, é sugerida na literatura como a maneira mais eficaz de reduzir os contaminantes biológicos e estimular o crescimento das microalgas (GULDHE *et al.*, 2017; RAMSUNDAR *et al.*, 2017). Entretanto, há casos como o de Cho e demais autores (2011), que ao cultivarem microalgas em efluentes secundários utilizando apenas a filtração (diâmetro do poro: 0,22 μm) ou a autoclavagem como método de esterilização, obtiveram maiores valores de produtividade com os cultivos que foram apenas filtrados, ao invés dos autoclavados.

Há efluentes que naturalmente possuem menor concentração de sólidos em suspensão, o que melhora a penetração de luz na coluna d'água, mas que ainda mantém altas concentrações de nutrientes, como os efluentes de reatores anaeróbios do tipo UASB (CAVALCANTI *et al.*, 2001). Ainda, a razão molar N:P média para este tipo de efluente no Brasil é de 17:1, muito próxima da razão de Redfield de 16:1 (REDFIELD, 1958), ideal para cultivo de microalgas. Efluentes secundários de tratamentos aeróbios também podem ser utilizados, entretanto, apesar de possuírem ainda menos matéria orgânica e sólidos em suspensão, possuem uma concentração pequena de nitrogênio e fósforo. Para corrigir efluentes com baixas concentrações de nutrientes pode-se suplementá-los com efluentes concentrados, como os de desaguamento de lodo (ZHOU *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2011).

Existem métodos alternativos de filtragem do efluente (e.g. filtros de areia e brita) que poderiam ser aplicados em escala real com eficiência para o cultivo de microalgas, porém há escassez de estudos desse tipo. A utilização de consórcios de microalgas com outros microrganismos é uma outra estratégia que pode ser utilizada para “fortalecer” o cultivo frente às possíveis contaminações biológicas e variações ambientais (RASHID *et al.*, 2018), além de assegurar maior estabilidade do sistema em longo prazo (CHO *et al.*,

2017). A escolha das cepas é um passo muito importante para o sucesso dos cultivos, e seleções e triagens das mesmas são baseadas na composição do meio e no objetivo do cultivo em questão. Priorizar a utilização de espécies e consórcios nativos dos efluentes em que se pretende cultivá-los é uma abordagem que respeita as interações naturais entre o organismo e o meio. Gonçalves e demais autores (2016b), ao cultivarem *Chlorella vulgaris* sozinha e em consórcio com bactérias isoladas do sistema de tratamento de esgoto (*Enterobacter asburiae*, *Klebsiella* sp., ou *Raoultella ornithinolytica*), relataram maior taxa de crescimento, concentração celular, e remoção de nutrientes para os cultivos em consórcio.

Como estratégia para aumentar a produtividade dos cultivos de microalgas em efluentes, uma série de abordagens têm potencial para serem aplicadas, tais como: a suplementação com CO₂ e nutrientes; otimização do fotobiorreator para melhor captação de luz e trocas de gases; suplementação com carbono orgânico para crescimento mixotrófico; dentre outras (GULDHE *et al.*, 2017). Entretanto, a melhora na produtividade não deve ser priorizada em detrimento das práticas sustentáveis, e as estratégias de otimização devem ser embasadas no reuso de recursos, como o aproveitamento de gases de combustão ou biogás como fontes de CO₂ (ACIÉN *et al.*, 2016). Ademais, incrementos no consumo de energia e impactos ambientais que possivelmente acompanham as novas práticas no cultivo (e.g. compressão de gases; transporte) devem ser consideradas na avaliação dos sistemas, principalmente sob a ótica da análise de ciclo de vida (LCA). Antes de definir qual estratégia de otimização do cultivo pode ser aplicada, deve-se primeiro compreender toda a cinética do organismo em questão no efluente e condições em que se deseja cultivá-lo.

Conclusivamente, cultivos de microalgas em efluentes são uma integração de processos com potencial benéfico em principalmente três áreas: 1) tratamento terciário,

sendo que os cultivos podem ser projetados para cumprirem apenas os requisitos do lançamento, ou até mesmo para o reuso da água; 2) produção de biomassa, que pode ser utilizada para diversos fins, incluindo produção de bioenergia; e 3) sequestro de carbono, que gera um tipo de “crédito verde” para o sistema.

4. RESUMO GRÁFICO DA PESQUISA

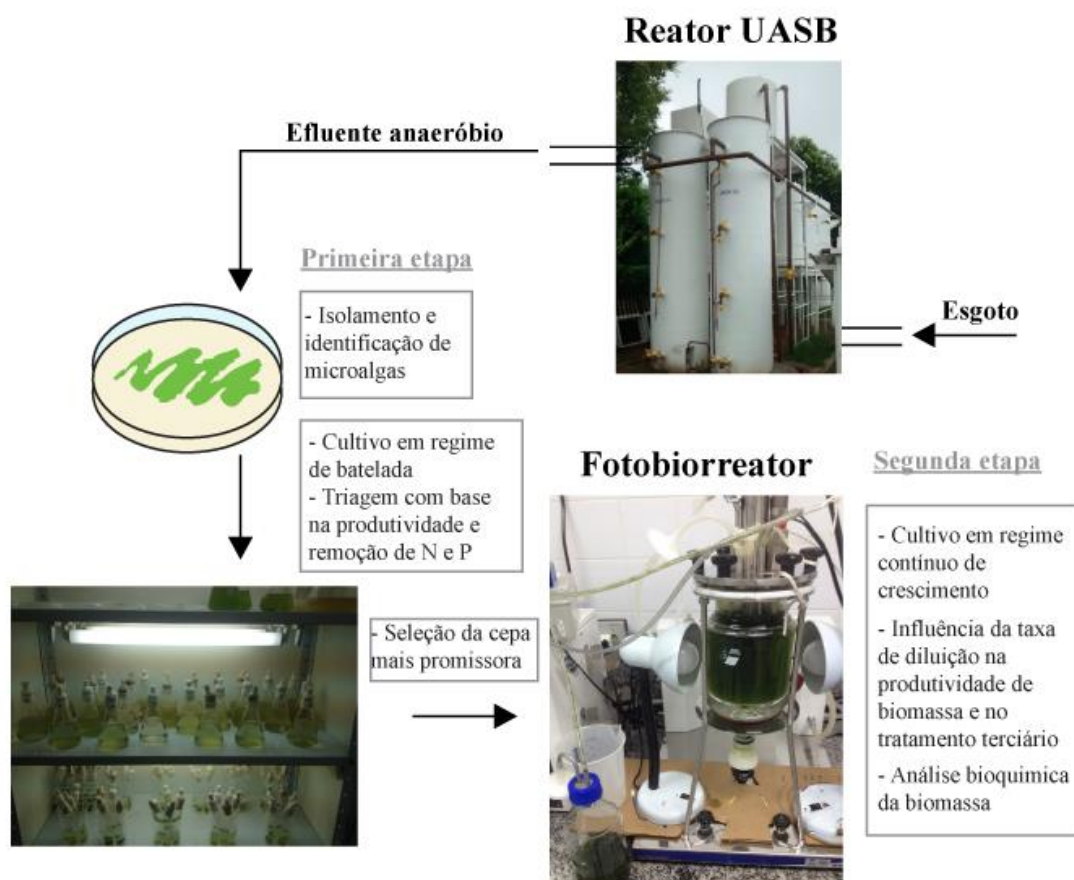


Figura 7. Fluxograma das atividades desenvolvidas nas duas etapas do estudo do cultivo de microalgas autóctones em efluente de reator anaeróbio. A primeira etapa resultou no Artigo 1 e a segunda etapa resultou no Artigo 2.

Fonte: autor.

5. ARTIGO 1: Isolamento, identificação e cultivo de microalgas com efluentes de reator anaeróbio do tipo UASB: Prospecção de cepas autóctones com potencial para produção de biomassa e tratamento terciário

5.1. Materiais e métodos

5.1.1. Descrição das áreas de estudo

Todas as etapas desta pesquisa foram realizadas na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), mais precisamente no Laboratório de Saneamento (LABSAN), situado no Centro Tecnológico (CT) do Departamento de Engenharia Ambiental (DEA), no campus de Vitória, ES.

A matéria-prima básica do presente estudo foi o efluente de um Reator Anaeróbio de Manta de Lodo (UASB) piloto, situado em uma das Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) da Companhia Espírito-santense de Saneamento (CESAN), localizada no bairro Araçás, município de Vila Velha, Espírito Santo (20°22'48"S; 40°19'31"W). O sistema piloto, por não estar integrado aos tratamentos da ETE Araçás, tem a capacidade de tratar uma vazão média de 0,56 L/s de esgoto sanitário de características médias. A Figura 8A apresenta uma visão global da ETE Araçás, com destaque para o sistema piloto, enquanto que a Figura 8B mostra as duas unidades de reatores UASB contidas nesse sistema.



Figura 8. A) Visão global da ETE Araçás, situada em Vila Velha, ES; e B) duas unidades de reatores UASB contidas no sistema piloto.

Fonte: A) Google Earth, acesso em 25/11/2017; e B) autor.

5.1.2. Isolamento e identificação de microalgas

O efluente UASB do sistema piloto foi coletado em recipientes plásticos de 5 L e levado às dependências do laboratório, onde foi mantido no escuro por um período de três horas para decantação de sólidos sedimentáveis. Após esse período, o sobrenadante foi transferido para frascos Erlenmeyers de 1L de capacidade com tampas de algodão hidrofóbico e gaze. Os frascos foram então acondicionados em uma bancada próxima à janela, de modo que fossem iluminados indiretamente pelo sol, para estimular naturalmente o desenvolvimento de microrganismos fotoautotróficos. Os frascos foram monitorados visualmente até que se tornassem esverdeados, e a partir desse momento, amostras foram coletadas e observadas em um microscópio óptico (Carl ZEISS Axioplan-2).

Para se isolar as microalgas das amostras, foi empregada a técnica da micropipetagem (ANDERSEN & KAWACHII, 2005) associada ao esgotamento por estrias em meio ágar-efluente (efluente filtrado e autoclavado com 1,5% de ágar). Colônias unialgais foram inoculadas individualmente em tubos de ensaio contendo 20 mL de efluente autoclavado e mantidas em ambiente com temperatura controlada (25 ± 2

°C), luminosidade média de 4300 lux, e fotoperíodo de 12/12h. A comunidade original de microrganismos, da qual todos os isolados foram obtidos, também foi armazenada como as outras cepas.

As culturas foram renovadas quinzenalmente segundo Lorenz e colaboradores (2005). Para eliminar ou reduzir a concentração de bactérias associadas às culturas unialgais, estas foram purificadas em um meio composto por efluente autoclavado e os seguintes antibióticos: penicilina G (200 mg/L); sulfato de gentamicina (50 mg/L); e ácido nalidíxico (100 mg/L), de acordo com Guillard (2005). No caso de contaminação por fungos, a estratégia adotada foi a de separar fisicamente as colônias de microalgas das colônias de fungos em meio sólido.

Para identificação das microalgas foi utilizado o atlas de Streble e Krauter (1987), a chave de identificação de Bicudo e Menezes (2005), os trabalhos de Fanés e demais autores (2009), González (1996), e a ferramenta de busca taxonômica do site AlgaeBase.

5.1.3. Coleta e caracterização do efluente de UASB para cultivo

Para remover os sólidos em suspensão, que poderiam influenciar na turbidez do meio, o efluente foi coletado e filtrado em membrana de fibra de vidro do tipo GF1 (0,7 µm; MACHEREY-NAGEL) e armazenado em frascos limpos até o início do experimento. Paralelamente, amostras desse efluente foram analisadas em triplicata para todos os parâmetros contidos na Tabela 9, onde também são apresentados os tipos de metodologia de análise, equipamentos utilizados e referências. Nessa etapa do estudo, o efluente não-esterilizado obtido de acordo com esta seção foi denominado “ENE”.

Tabela 9. Metodologias de análise do efluente não-esterilizado (ENE) para o cultivo em batelada.

Parâmetro	Princípio do Método	Equipamento	Referência
pH	Potenciometria	Medidor de pH Orion 4 Star, Thermo-Scientific	APHA (2005) 4500-H ⁺ B
Turbidez	Nefelometria	Turbidímetro 2100P, HACH	APHA (2005) 2130 B
Alcalinidade Total	Titulometria	-	APHA (2005) 2320 B
Demanda Química de Oxigênio (DQO)	Colorimetria	Espectrofotômetro DR/2000, HACH	APHA (2005) 5220 D
Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK)	Titulometria	-	APHA (2005) 4500-N _{org} B
Nitrogênio Amoniacal (NH ₄ ⁺)	Titulometria	-	APHA (2005) 4500-NH ₃ C
Nitrato (NO ₃ ⁻)	Cromatografia Iônica	IC Basic Plus 883 -METROHM /Metrosep A Supp 5-150/4.0 (NaHCO ₃ 1 mM; Na ₂ CO ₃ 4 mM)	Kissner & Koppenol (1986)
Nitrito (NO ₂ ⁻)	Cromatografia Iônica	IC Basic Plus 883 -METROHM /Metrosep A Supp 5-150/4.0 (NaHCO ₃ 1 mM; Na ₂ CO ₃ 4 mM)	Kissner & Koppenol (1986)
Fósforo Total (PT)	Colorimetria	Espectrofotômetro DR/2000, HACH	APHA (2005) 4500-P E
Fosfato (PO ₄ ³⁻)	Cromatografia Iônica	IC Basic Plus 883 -METROHM /Metrosep A Supp 5-150/4.0 (NaHCO ₃ 1 mM; Na ₂ CO ₃ 4 mM)	Urasa & Ferede (1986)
Bactérias Heterotróficas Totais (BHT)	<i>Pour plate</i> e contagem	-	APHA (2005) 9215 B

5.1.4. Cultivo de microalgas em batelada com efluente não-esterilizado

5.1.4.1. Descrição das condições experimentais

Após o isolamento e identificação das cepas de microalgas, foi estabelecido um banco de espécies, onde o meio de cultivo era o efluente autoclavado. Entretanto, como o objetivo desse experimento foi o de analisar o crescimento das microalgas em efluente não-esterilizado (ENE), as cepas foram aclimatadas à esse tipo de efluente em tubos de

ensaio por no mínimo uma semana antes do início do experimento, o que minimizou o impacto da transferência de um ambiente para o outro.

Os cultivos de microalgas foram realizados em frascos Erlenmeyers de 500 mL, em triplicata, utilizando o ENE como meio. Os inóculos foram obtidos de culturas em fase exponencial de crescimento, confirmada através de medições diárias de densidade óptica (DO_{750}) com um espectrofotômetro Ultrospec 1000 (Pharmacia Biotech). O processo de inoculação foi realizado da seguinte maneira: para cada espécie, um frasco de 3 L foi preenchido com 2,5 L de ENE e então o inóculo em questão foi adicionado, pouco a pouco, até que a DO_{750} marcasse o valor de 0,1 abs, utilizando o ENE como branco. O volume de inóculo variou de espécie para espécie, entretanto se situou entre 20 e 30 mL para cada 2,5 L de ENE (aproximadamente 1% v/v). Após a inoculação, o conteúdo do frasco maior foi transferido para três frascos menores de 500 mL, que representaram as repetições do experimento para cada cepa. Como controle negativo, três frascos foram preenchidos apenas com ENE e monitorados juntamente com os cultivos.

O experimento durou 16 dias e as condições foram: luminosidade de aproximadamente 4300 lux, que foi medida com um luxímetro portátil ITLD 260 (Instrutemp) na metade da altura dos frascos; fotoperíodo de 12/12 h a 25 ± 2 °C; e agitação manual uma vez por dia, momentos antes de cada coleta. O posicionamento dos frascos de cultivo foi alternado diariamente para compensar possíveis discrepâncias na incidência luminosa entre os frascos. Todos os cultivos foram monitorados com microscópio óptico, a cada dois dias, para checar possíveis alterações nas composições microbiológicas. Não foi aplicado nenhum tipo de aeração, suplementação de carbono ou controle de pH nos cultivos, com o objetivo de analisar o potencial natural das cepas de crescerem e se desenvolverem em ENE.

5.1.4.2. Avaliação da biomassa e parâmetros de crescimento

Para avaliar o crescimento de cada cepa de microalga em ENE, amostras diárias dos cultivos foram coletadas às 12:30, com o objetivo de evitar dispersão de valores nas séries temporais (WOOD *et al.*, 2005). Os parâmetros monitorados diariamente foram: densidade óptica (DO₇₅₀); concentração de clorofila *a in vivo*, medida com um fluorímetro da marca AquaFluor; e pH. As medidas indiretas de avaliação da biomassa (DO₇₅₀ e clorofila *a*) foram monitoradas para estabelecer uma relação com a concentração de biomassa, que foi medida gravimetricamente (APHA, 2005; 2540 D) a cada 4 dias.

Para cada cepa foi realizada a correlação entre a biomassa e os parâmetros indiretos e obtidas curvas de calibração. As curvas de crescimento para cada cepa foram definidas pela relação entre o tempo e a concentração de biomassa estimada. Após a identificação das fases exponenciais definiu-se as taxas de crescimento específico (dia⁻¹) para cada cepa, de acordo com a equação abaixo:

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1} \quad (8)$$

onde X_1 e X_2 são a concentração de biomassa (mg L⁻¹) no início (t_1) e fim (t_2) da fase exponencial de crescimento, respectivamente (WOOD *et al.*, 2005). A produtividade volumétrica de biomassa (PB; mg L⁻¹ d⁻¹), foi calculada de acordo com a Equação 9:

$$PB = \frac{X_f - X_i}{t_f - t_i} \quad (9)$$

onde X_i e X_f são, respectivamente, a concentração de biomassa nos tempos inicial (t_i) e final (t_f) do experimento. A concentração máxima de biomassa atingida pelos cultivos ($X_{máx}$) também foi registrada.

5.1.4.3. Análise da remoção de nutrientes, DQO e bactérias

No tempo final do experimento, os cultivos foram filtrados em membranas de fibra de vidro (0,7 µm) e a fase líquida foi analisada para todos os parâmetros contidos na Tabela 9. As concentrações de nitrogênio, fósforo, e DQO foram comparadas com as respectivas concentrações iniciais através da seguinte equação:

$$ER = \frac{S_i - S_f}{S_i} \times 100 \quad (10)$$

onde ER é a eficiência de remoção (%), S_i representa a concentração do nutriente em questão na fase líquida do início do cultivo, e S_f representa a concentração no final. A mesma lógica foi aplicada para a concentração de bactérias heterotróficas totais (BHT; CFU mL⁻¹). Entretanto, as amostras para análise de bactérias do tempo final não foram filtradas, a fim de evitar a subestimação dos valores devido à adsorção das bactérias à superfície celular das microalgas e ao filtro.

5.1.5. Análise estatística

Os resultados foram expressos em médias com desvio padrão das triplicatas e repetições. Os dados foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey post-hoc, para determinar diferenças significativas entre as médias, com nível de significância de 0,05. O pacote de software utilizado foi o Paleontological Statistics (PAST v 3.14).

5.2. Resultados e discussão

5.2.1. Isolamento e identificação das microalgas

A análise microscópica da floração natural de microrganismos do efluente UASB revelou a presença de diversos gêneros de microalgas, dentre eles representantes das divisões: Chlorophyta (*Chlorella*; *Desmodesmus*; *Tetradismus*; *Scenedesmus*; *Chlamydomonas*; *Chlorococcum*; *Oocystis*; dentre outros); Bacillariophyta (*Gomphonema*); e, em menor quantidade, Euglenophyta (*Trachelomonas*). Representantes do filo Cyanobacteria (*Synechocystis*; *Oscillatoria*) também se encontravam nas amostras, bem como hifas de fungos. Protozoários ciliados foram visualizados e, em todas as amostras, alimentavam-se de microalgas. Em termos gerais foram encontrados microrganismos que normalmente colonizam efluentes de tratamento de esgoto, entretanto o foco foi dado aos representantes da divisão Chlorophyta.

Sete espécies de microalgas verdes foram isoladas e identificadas como: *Chlorococcum* sp. L04; *Chlorella* sp. L06; *Scenedesmus* sp. L08; *Tetradismus* sp. L09; *Oocystis* sp. L10; *Chlorella* sp. L11; e *Chlorella* sp. L12, como pode-se observar na Figura 9. Espécies dos gêneros *Chlorella* e *Scenedesmus* já foram amplamente utilizadas em cultivos em efluentes, principalmente devido à sua resiliência, capacidade de crescimento e absorção de nutrientes (LV *et al.*, 2017).

Dentre as espécies isoladas, a *Oocystis* sp. L10 não foi utilizada como inóculo para cultivos devido à sua formação excessiva de mucilagem e à tendência para formar flocos, que interferiam na leitura da absorbância. A floração natural inicial de microrganismos, da qual todas as cepas foram isoladas, foi mantida tal como as outras espécies e foi denominada Inóculo Misto (IM).

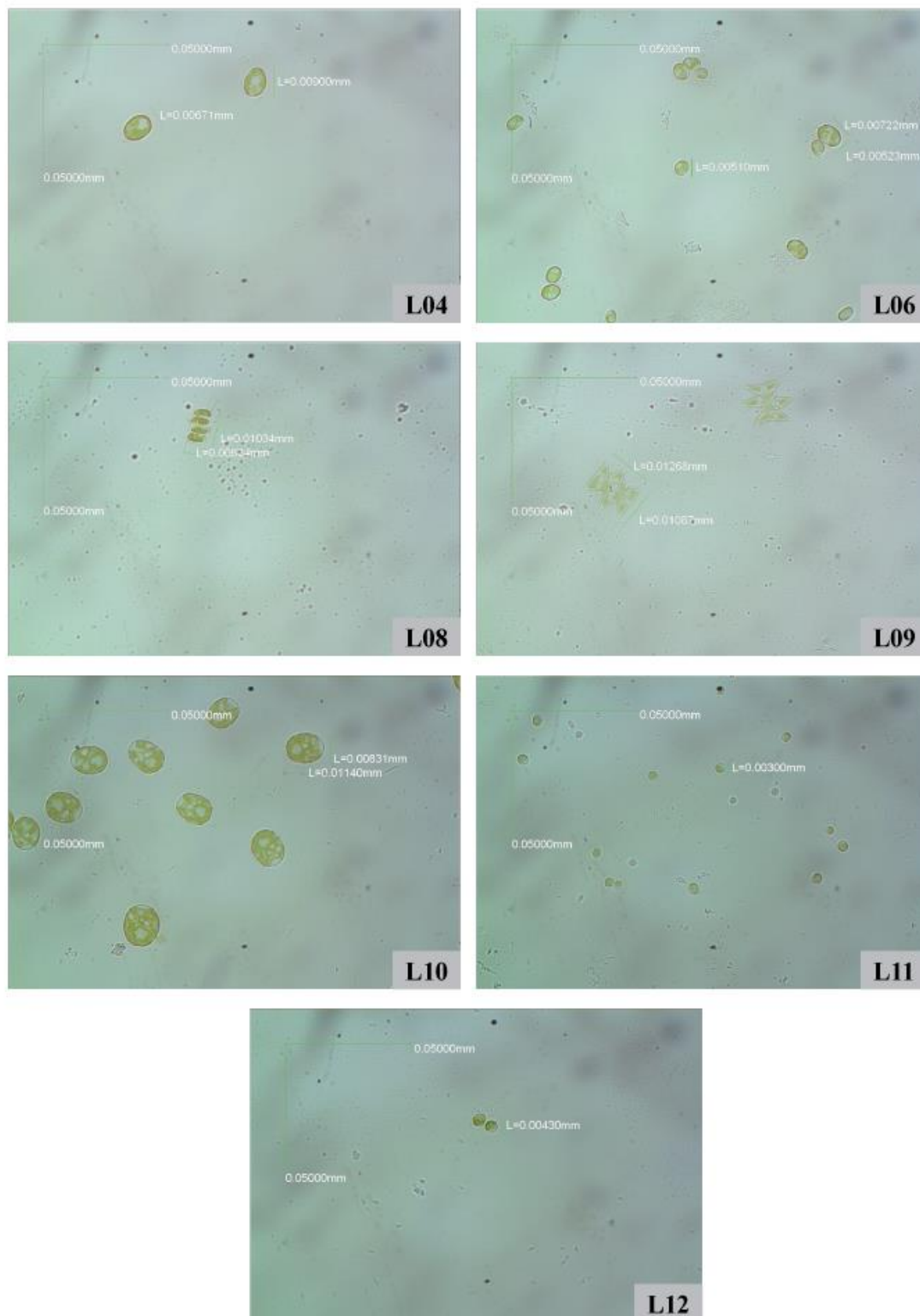


Figura 9. Espécies de microalgas isoladas do efluente de UASB (aumento de 400 x). *Chlorococcum* sp. L04; *Chlorella* sp. L06; *Scenedesmus* sp. L08; *Tetradesmus* sp. L09; *Oocystis* sp. L10; *Chlorella* sp. L11; e *Chlorella* sp. L12

Fonte: autor.

5.2.2. Perfil físico-químico e microbiológico do ENE

O efluente de UASB utilizado para o cultivo de microalgas em batelada (ENE) foi caracterizado em relação às suas propriedades físico-químicas e microbiológicas (Tabela 10).

Tabela 10. Perfil físico-químico e microbiológico do ENE utilizado para o cultivo em batelada.

Parâmetro	Unidade	Valor (n = 3)
pH	-	7,5
Turbidez	UNT	4
Alcalinidade Total	mg CaCO ₃ L ⁻¹	266,0 ± 9,9
Demanda Química de Oxigênio (DQO)	mg O ₂ L ⁻¹	77,1 ± 2,4
Nitrogênio Total (NT)	mg N L ⁻¹	45,96 ± 2,30
Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK)	mg N L ⁻¹	44,50 ± 1,85
Nitrogênio Amoniacal (NH ₄ ⁺)	mg NH ₄ ⁺ -N L ⁻¹	43,45 ± 1,14
Nitrato (NO ₃ ⁻)	mg NO ₃ ⁻ -N L ⁻¹	0,34
Nitrito (NO ₂ ⁻)	mg NO ₂ ⁻ -N L ⁻¹	1,12
Fósforo Total (PT)	mg P L ⁻¹	5,56 ± 0,25
Fosfato (PO ₄ ³⁻)	mg PO ₄ ³⁻ -P L ⁻¹	5,24
Razão molar N:P	-	17:1
Bactérias Heterotróficas Totais (BHT)	UFC mL ⁻¹	(5,7 ± 1,5) × 10 ⁸

A caracterização demonstrou que os valores de pH, turbidez e alcalinidade eram adequados para o crescimento fotoautotrófico, assim como as concentrações de nitrogênio biodisponível (NH₄⁺), fosfatos (PO₄³⁻) e razão N:P. Em relação ao nitrito (NO₂⁻), não era esperado encontrar o nitrogênio nessa forma química em efluente de sistema anaeróbico, pois a oxidação da NH₄⁺ para NO₂⁻ geralmente é realizada por organismos aeróbios, como *Nitrosomonas* sp. (SCHMIDT *et al.*, 2002), apesar de poder ocorrer também em condições anóxicas. Entretanto, o processo de filtragem do efluente pode ter

o oxigenado suficientemente para que ocorresse a oxidação de parte da amônia para nitrito, mas apenas parcialmente para o nitrato.

A concentração total de bactérias heterotróficas no ENE ($5,7 \pm 1,5 \times 10^8$) foi similar à concentração que foi aplicada por Gonçalves e colaboradores (2016b) em efluente secundário sintético para cultivar *Chlorella vulgaris* em consórcio com bactérias. Entretanto, estes pesquisadores inocularam as cepas de bactérias (*Enterobacter asburiae*, *Klebsiella* sp., ou *Raoultella ornithinolytica*). Já no presente estudo, foi utilizado efluente real com a comunidade bacteriana associada.

5.2.3. Desempenho das cepas isoladas

As cepas isoladas, bem como o inóculo misto (IM), foram cultivadas em regime de batelada utilizando ENE como meio de cultivo, e suas performances em relação à produção de biomassa e tratamento terciário foram comparadas.

5.2.3.1. Crescimento e produção de biomassa

Todas as microalgas isoladas foram capazes de crescerem e se desenvolverem no efluente não-esterilizado (ENE), alcançando a fase de crescimento exponencial (Figura 10). O crescimento foi descrito com base na concentração de biomassa, ao passo que na Figura 11 foi em termos de concentração de clorofila *a in vivo*. Estatisticamente, o crescimento foi melhor descrito pela concentração de biomassa, portanto este parâmetro foi utilizado para os cálculos cinéticos.

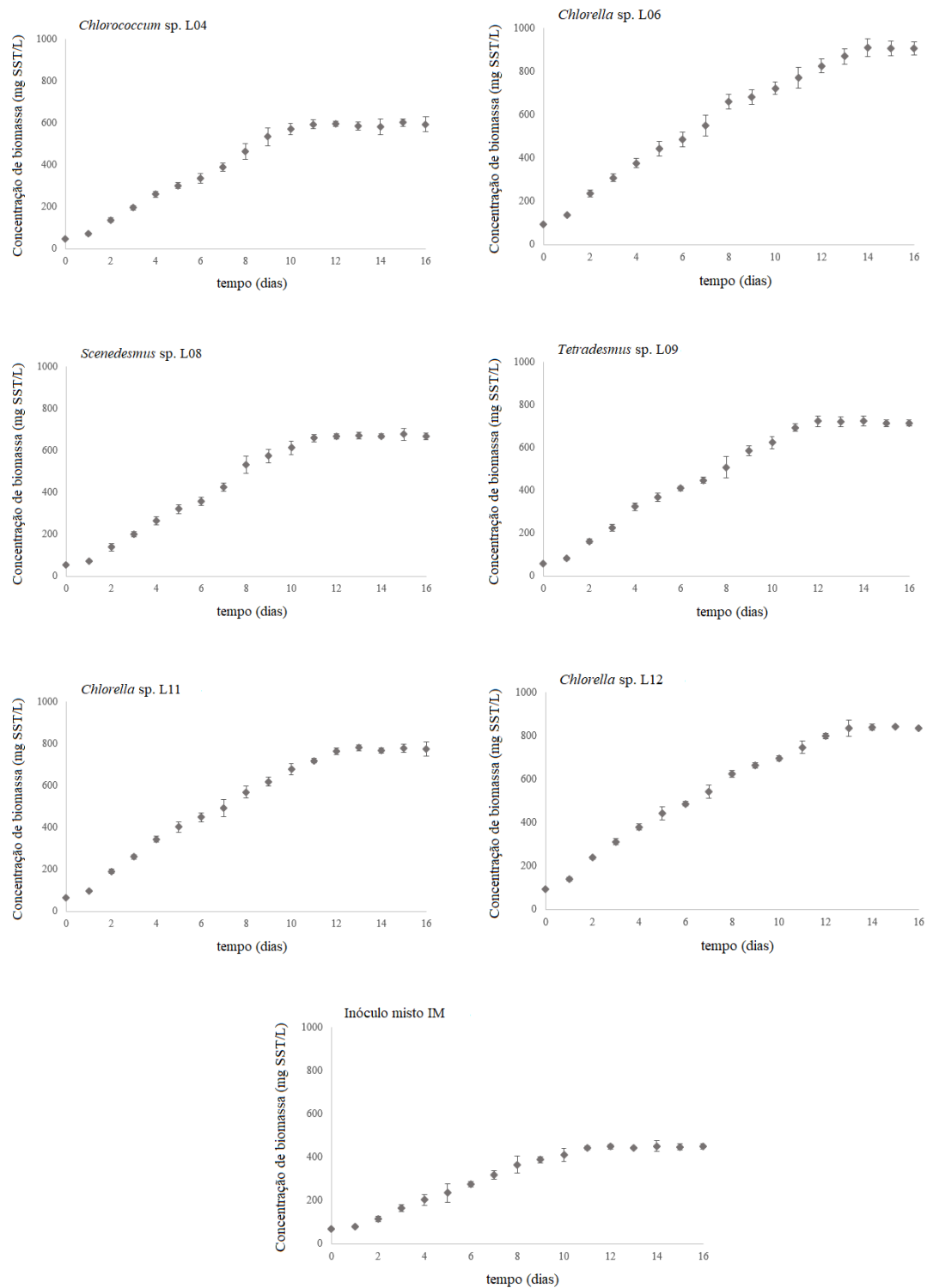


Figura 10. Curvas de crescimento das cepas microalgáceas isoladas e do Inóculo Misto (IM), cultivadas em ENE por 16 dias. Tempo (dias) no eixo das abcissas e concentração de biomassa (mg L^{-1}) no eixo das ordenadas ($n = 3$).

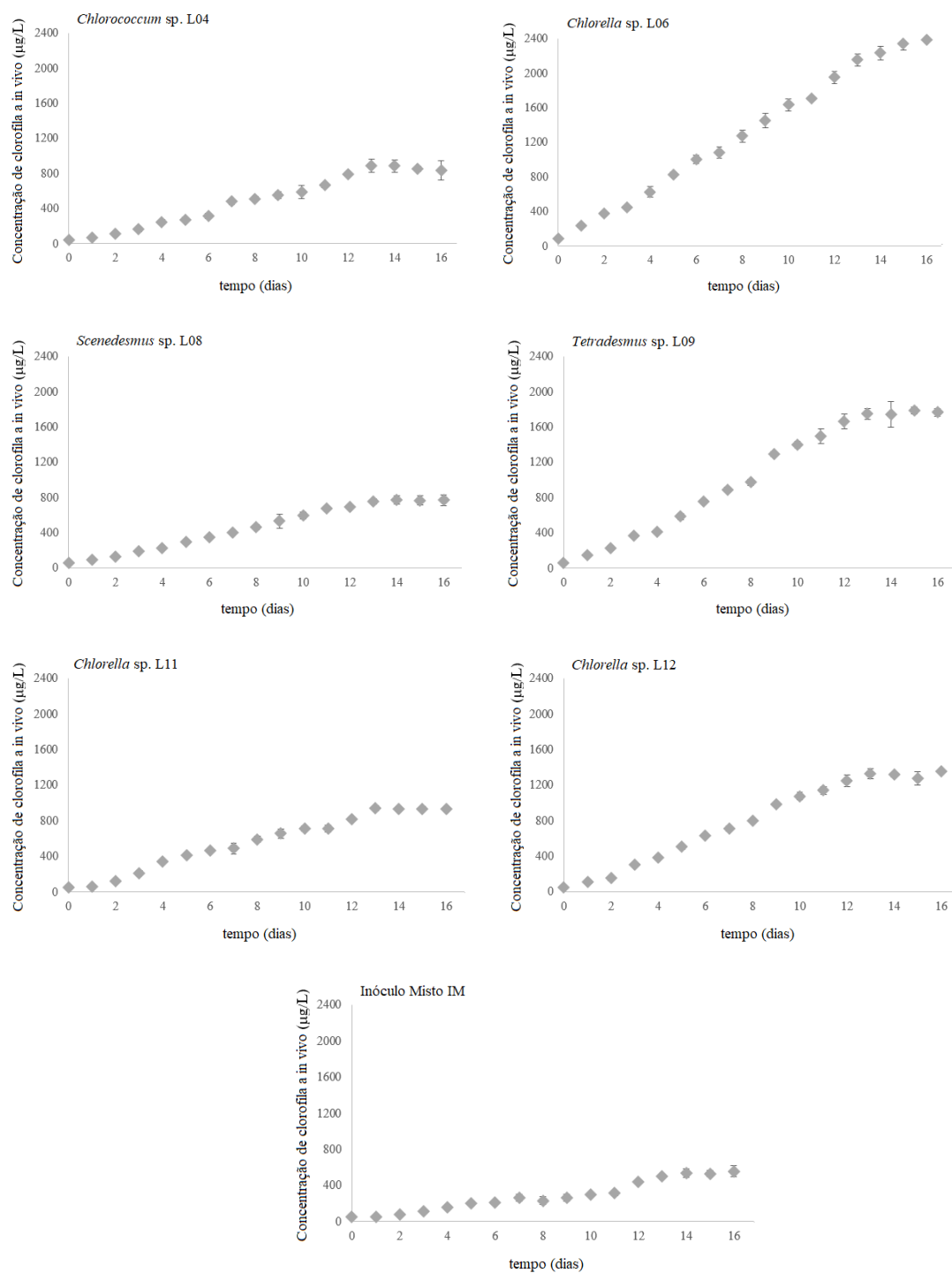


Figura 11. Curvas de crescimento das cepas microalgáceas isoladas e do Inóculo Misto (IM), cultivadas em ENE por 16 dias. Tempo (dias) no eixo das abscissas e concentração de clorofila *a in vivo* ($\mu\text{g L}^{-1}$) no eixo das ordenadas ($n = 3$).

Como esperado, a fase lag foi curta (um dia) para a maioria das cepas testadas, pois os inóculos foram retirados de culturas em fase de crescimento exponencial. Na avaliação microscópica, os cultivos monoalgáceos se encontravam dominados pelas cepas dos seus respectivos inóculos ao longo do experimento, apesar da presença de alguns protozoários ciliados em algumas amostras. Uma explicação para a dominância de cada microalga é que, por terem sido isoladas do mesmo efluente no qual foram cultivadas, essas cepas possuem a capacidade inata de competir com os outros microrganismos ou possíveis condições inibitórias deste meio (CHO *et al.*, 2017). Ademais, a coexistência das microalgas com as bactérias nativas do efluente não pareceu ter tido um efeito deletério nas microalgas, visto que a coloração da maioria das culturas era de um verde-esmeralda escuro, um indício da saúde da comunidade fotoautotrófica.

Em relação ao ENE, é sabido que efluentes secundários de sistemas anaeróbios de tratamento de esgoto possuem algumas características benéficas para o crescimento de microalgas, como a baixa turbidez e carga orgânica, o que previne o crescimento excessivo da comunidade heterotrófica (CHERNICHARO *et al.*, 2001). Além disso, a razão molar N:P foi de 17:1 (Tabela 10), próxima da razão ideal de 16:1 (REDFIELD, 1958).

A evolução do pH de todas as culturas seguiu um padrão similar. No dia inicial do experimento, o pH foi de 7,5 para todas as cepas, e no 6º dia os valores variaram de 9,8 a 10,5, os quais foram mantidos aproximadamente até os dias finais, com valores variando de 10,2 a 11,0. O aumento do pH está associado à absorção e aproveitamento de CO₂ pelas microalgas, o que causa um desequilíbrio na especiação de carbono inorgânico no meio líquido, resultando em depleção de prótons (CHI *et al.*, 2011). Como nenhum método de controle de pH foi utilizado neste estudo, como aeração, fornecimento de CO₂ gasoso ou adição de tampão, o aumento do pH era esperado. No entanto, mesmo se a

aeração constante fosse aplicada, o aumento do pH ainda ocorreria. No experimento de dezesseis dias conduzido por Mennaa e colaboradores (2015), onde aeração constante foi fornecida a culturas de microalgas em modo de batelada com efluente, um aumento de pH de 7,0 a 10,3 foi observado após apenas três dias de operação. Apesar disso, esses pesquisadores obtiveram taxas de crescimento e produtividade notáveis durante o experimento, até os valores de $\mu = 0,52 \text{ d}^{-1}$ e $P = 118 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

A Tabela 11 mostra os resultados dos parâmetros cinéticos de crescimento para cada cepa em regime de batelada e cultivada em ENE no presente estudo.

Tabela 11. Parâmetros cinéticos de crescimento para os cultivos de microalgas em ENE em regime de batelada. As cepas foram: *Chlorococcum* sp. L04; *Chlorella* sp. L06; *Scenedesmus* sp. L08; *Tetradismus* sp. L09; *Oocystis* sp. L10; *Chlorella* sp. L11; *Chlorella* sp. L12; e Inóculo Misto IM.

Parâmetro	Cepa microalgácea						
	L04	L06	L08	L09	L11	L12	IM
Taxa de crescimento específica μ (d^{-1})	$0,1865 \pm 0,0036$	$0,2432 \pm 0,0041$	$0,1954 \pm 0,0033$	$0,1982 \pm 0,0052$	$0,1924 \pm 0,0035$	$0,2101 \pm 0,0061$	$0,1586 \pm 0,0053$
R^2	0,9932	0,9897	0,9924	0,9857	0,9910	0,9877	0,9781
Concentração máxima de biomassa $X_{\text{máx}}$ (mg L^{-1})	594	905	666	715	774	835	450
Produtividade de biomassa ($\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$)	$46 \pm 1,2$	$72 \pm 1,9$	$51 \pm 2,1$	$54 \pm 2,8$	$58 \pm 1,5$	$58 \pm 3,1$	$31 \pm 1,9$

Houve diferenças significativas entre as cepas, com taxas de crescimento variando de $0,1586 \text{ d}^{-1}$ (Inóculo Misto) até $0,2432 \text{ d}^{-1}$ (*Chlorella* sp. L06). Essa variação pode ser atribuída às diferentes capacidades das cepas de se adaptarem e crescerem no meio e nas condições fornecidas. Três grupos podem ser distinguidos em relação à taxa de crescimento específica: o primeiro, formado apenas pelo IM, com a menor taxa; o segundo, englobando L04, L08, L09, L11 e L12, com valores variando de $0,1865$ a $0,2101 \text{ d}^{-1}$; e o terceiro grupo, composto somente por L06, com a maior taxa de crescimento ($0,2432 \text{ d}^{-1}$). Em relação à produtividade de biomassa, a resposta foi similar, com valores variando de $31 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (IM) até $72 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (L06).

Os valores de μ obtidos por Kim e colaboradores (2016), ao cultivarem *Scenedesmus* sp. e *Chlorella* sp. em efluente de UASB sintético esterilizado com suplementação de CO_2 , foram $0,26$ e $0,29 \text{ d}^{-1}$, respectivamente, comparados a $0,19$ e $0,24 \text{ d}^{-1}$ obtidos neste estudo, para cepas do mesmo gênero. Nesse mesmo estudo, atingiram uma produtividade de $90 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ para *Chlorella vulgaris*. Entretanto, a maior concentração de nutrientes (TN: 118 e TP: 35 mg L^{-1}) somada à esterilização do meio e bombeamento constante de CO_2 provavelmente contribuíram para esses resultados.

Os resultados de taxas de crescimento e produtividade obtidos no presente estudo estão dentro do intervalo obtido por vários autores usando efluentes secundários para cultivar microalgas, como evidenciado por uma recente meta-análise sobre o assunto (LV *et al.*, 2017). No entanto, diferentemente da maioria desses outros estudos, aqui não foram aplicados borbulhamento de ar, controle de pH, suplementação de CO_2 ou esterilização do meio.

Apesar de cada cepa isolada ter apresentado melhores parâmetros de crescimento quando comparada com o Inóculo Misto (Tabela 11), é crucial destacar as vantagens que as culturas consorciadas têm sobre as culturas monoalgáceas em condições externas, como resiliência a mudanças ambientais e contaminação externa (KAZAMIA *et al.*, 2014). Além disso, Cho e demais autores (2017) demonstraram que a diversidade de microalgas promove a estabilização da produtividade de biomassa em LATs tratando efluentes de tratamento de esgoto.

De fato, um estudo conduzido por Mennaa e colaboradores (2015) alcançou maior taxa de crescimento ($0,52 \text{ d}^{-1}$) e produtividade de biomassa em batelada ($118 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) para a proliferação de microalgas indígenas, quando comparada com várias culturas monoalgáceas, utilizando efluente pré-tratado como meio de cultivo. Entretanto, essas cepas utilizadas por esses autores não foram isoladas do efluente usado em seu experimento, pois vieram das Coleções de Cultura (UTEX e SAG), não conflitando com os resultados obtidos no presente estudo. Além disso, Stemmler e demais autores (2016) compararam os parâmetros de crescimento de cepas de microalgas que foram isoladas de efluentes com cepas fornecidas por coleções de culturas, e as primeiras foram maiores que as últimas, reafirmando assim os benefícios da triagem de cepas autóctones para melhores respostas de crescimento em efluentes de tratamento de esgoto.

5.2.3.2. Tratamento terciário

A Tabela 12 mostra as médias das concentrações de nitrogênio, fósforo, DQO e BHT para as culturas no início ($t = 0$) e no final ($t = 16$) do experimento, após filtragem. Já na Figura 12 os valores são expressos em porcentagem, incluindo o controle negativo, para confirmar se as remoções ocorreram devido apenas às microalgas.

Tabela 12. Médias das concentrações de nutrientes, DQO, e bactérias na fase líquida do ENE (início) e na fase líquida dos cultivos no 16º dia do experimento (final), após filtragem da biomassa. As cepas foram: *Chlorococcum* sp. L04; *Chlorella* sp. L06; *Scenedesmus* sp. L08; *Tetrademus* sp. L09; *Oocystis* sp. L10; *Chlorella* sp. L11; *Chlorella* sp. L12; e Inóculo Misto IM. As unidades estão em mg L⁻¹, com exceção da concentração de bactérias heterotróficas totais (BHT), que está em UFC mL⁻¹.

Parâmetro	Cepa microalgácea						
	L04	L06	L08	L09	L11	L12	IM
NT (início)	45,96	45,96	45,96	45,96	45,96	45,96	45,96
NT (final)	8,92	2,77	7,99	4,05	3,74	2,98	15,49
NH ₄ ⁺ (início)	43,45	43,45	43,45	43,45	43,45	43,45	43,45
NH ₄ ⁺ (final)	7,2	1,6	6,4	2,4	2,1	1,5	13,2
NO ₃ ⁻ (início)	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34
NO ₃ ⁻ (final)	1,72	1,15	1,54	1,65	1,61	1,08	2,34
NO ₂ ⁻ (início)	1,12	1,12	1,12	1,12	1,12	1,12	1,12
NO ₂ ⁻ (final)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
PO ₄ ³⁻ (início)	5,24	5,24	5,24	5,24	5,24	5,24	5,24
PO ₄ ³⁻ (final)	0,76	0,18	0,60	0,40	0,26	0,21	1,11
DQO (início)	77,1	77,1	77,1	77,1	77,1	77,1	77,1
DQO (final)	15,29	6,49	14,67	9,50	7,83	6,84	36,96
BHT (início)	$5,7 \times 10^8$	$5,7 \times 10^8$	$5,7 \times 10^8$	$5,7 \times 10^8$	$5,7 \times 10^8$	$5,7 \times 10^8$	$5,7 \times 10^8$
BHT (final)	$7,1 \times 10^6$	$6,6 \times 10^5$	$6,8 \times 10^6$	$5,0 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$	$7,5 \times 10^5$	$1,2 \times 10^7$

N.D. = não detectado.

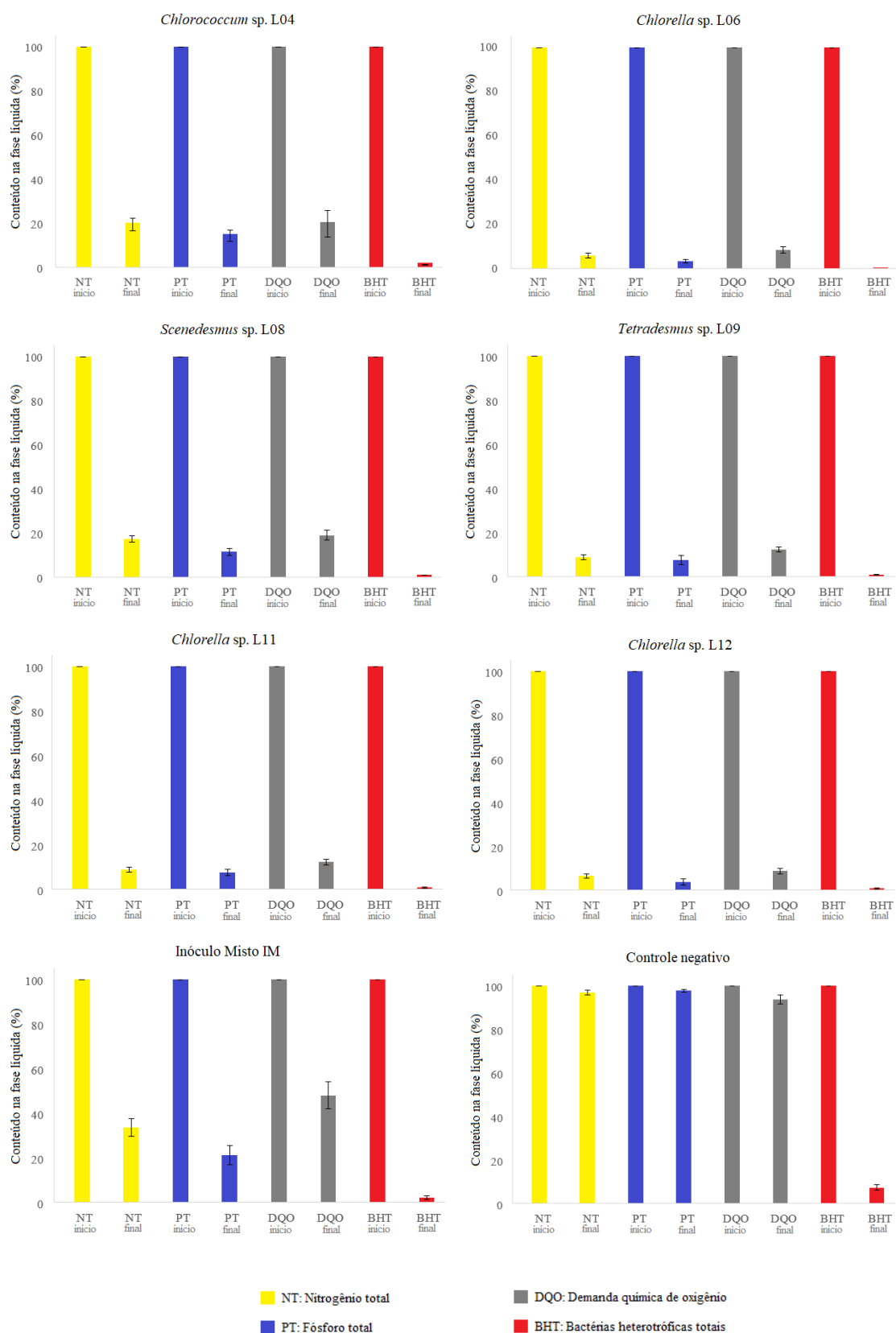


Figura 12. Concentrações de nutrientes, DQO e bactérias heterotróficas totais no início dos cultivos ($t = 0$) e no final ($t = 16$), após filtragem da biomassa (amostras para BHT não foram filtradas). A eficiência de remoção (ER; %) é calculada como a diferença entre a porcentagem inicial e final. O controle negativo se consistiu em frascos com ENE sem inóculo de microalgas ($n = 3$).

Pode-se observar que ao final do experimento, a eficiência de remoção de NT variou de 66,3% (IM) até mais de 90% (*Chlorella* sp. L06; *Tetrademus* sp. L09; *Chlorella* sp. L11; e *Chlorella* sp. L12). Em relação ao PT, a eficiência de remoção foi superior a 80% para todas as culturas, com L06 e L12 chegando a 96%. Em termos de DQO, é interessante notar que sua concentração já era baixa no início do experimento (77,1 mg L⁻¹) como esperado, uma vez que os efluentes secundários de tratamentos anaeróbios são geralmente baixos em DQO e DBO (CHERNICHARO *et al.*, 2001).

No entanto, a eficiência de remoção de DQO solúvel variou de 52% (IM) a mais de 90% (L06 e L12). Esses valores são consideravelmente maiores do que a remoção de 13,8 a 24,8% obtida por Cho e colaboradores (2011) ao cultivarem *Chlorella* sp. em efluente secundário filtrado e desinfetado com UV. Por outro lado, Li e demais autores (2011) obtiveram 90 % de remoção de DQO ao cultivarem *Chlorella* sp. em efluente com concentração inicial de DQO de 2304 mg L⁻¹.

A remoção de DQO no presente estudo pode ser explicada pelo fato de que uma alta taxa de fotossíntese gera uma alta concentração de O₂ nos meios, e essa alta concentração de O₂ aumenta as taxas de oxidação de matéria orgânica pelas bactérias nativas do efluente. Alternativamente, algumas cepas de microalgas são capazes de usar carbono orgânico para crescimento, ao invés de usar apenas CO₂, operando em regime de mixotrofia e contribuindo para a remoção desta fração de carbono (JEBALI *et al.*, 2015).

Em relação às bactérias heterotróficas totais (BHT), todos os cultivos apresentaram redução expressiva (> 99%) das concentrações. Contudo, o controle negativo também apresentou alta redução (92,7%), o que sugere que as algas não foram as únicas responsáveis pelo decaimento da comunidade heterotrófica. A depleção de carbono orgânico pode ter sido um fator decisivo para a redução observada no controle.

Os resultados para a eficiência de remoção de NT e PT em batelada são semelhantes aos obtidos por Mennaa e colaboradores (2015), e se encontram na faixa de valores relatados em uma revisão recente de cultivos de microalgas em efluente secundário de tratamento de esgoto (LV *et al.*, 2017). Por outro lado, como o pH de todas as culturas alcançou valores acima de 9,0, pode ser razoável supor que pelo menos parte do nitrogênio tenha sido perdido devido a processos abióticos como o *stripping* da amônia, ao invés da assimilação completa por microrganismos (NURDOGAN & OSWALD, 1995). Em relação à remoção de fósforo, uma fração desse componente pode ter sido perdida para a precipitação química, uma vez que esse processo também ocorre em valores de pH acima de 9,0 (HAMMOUDA *et al.*, 1995).

É interessante notar que as concentrações de nitrato no final do experimento (1,30 a 2,54 mg L⁻¹) foram maiores que a concentração inicial (0,34 mg L⁻¹) para todas as culturas, incluindo o controle negativo, sugerindo que a nitrificação ocorreu e que as bactérias nitrificantes já estavam presentes no efluente no início do experimento. De fato, González-Camejo e colaboradores (2018) estudaram a competição entre microalgas e bactérias nitrificantes crescendo em efluente não-esterilizado e sugeriram que a intensidade da luz e a temperatura foram os principais fatores que controlaram essa interação, com altas luminosidades ($> 85 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e temperaturas controladas ($< 32 \text{ }^{\circ}\text{C}$) favorecendo as microalgas na competição. No presente estudo, a intensidade de luz (400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e a temperatura ($27 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$) corroboram com os resultados obtidos por González-Camejo e colaboradores (2018), considerando que apenas uma pequena fração da concentração inicial de amônio foi oxidada em nitrato.

5.3. Conclusões

Todas as microalgas isoladas, assim como o inóculo misto, foram capazes de crescerem e se desenvolverem em efluente não-esterilizado de reator UASB. As taxas de crescimento e produtividade de biomassa foram comparáveis a outros estudos onde os autores exerceram mais controle sobre os cultivos, como esterilização do meio ou suplementação com CO₂. Isso indica que o cultivo de microalgas autóctones é uma boa prática para obter boas respostas de crescimento em efluente. Todas as culturas monoalgáceas apresentaram maior crescimento quando comparadas com o Inóculo Misto.

Em relação à remoção de nutrientes, todos os cultivos apresentaram redução substancial de nitrogênio e fósforo. Mais uma vez, cultivos monoalgáceos foram superiores ao cultivo misto. É possível que parte dessa redução tenha se dado por meios não biológicos, como *stripping* da amônia ou precipitação do fósforo. A cepa que apresentou maior potencial para produção de biomassa e remoção de nutrientes foi a *Chlorella* sp. L06.

6. ARTIGO 2: Cultivo de cepa autóctone de microalga em regime contínuo com efluente de UASB: Efeito da taxa de diluição na produtividade e composição da biomassa, tratamento terciário e remoção de bioindicadores

6.1. Materiais e métodos

6.1.1. Coleta e análise do efluente de UASB para cultivo

Para os experimentos em regime contínuo de crescimento, foram utilizadas diferentes levas de efluente não-esterilizado de UASB, devido à necessidade contínua de suprimento para o sistema. Entretanto, cada leva foi caracterizada antes da sua adição ao sistema de cultivo, a fim de reduzir possíveis superestimacões nos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do efluente. As amostras de efluente foram analisadas em triplicata para todos os parâmetros contidos na Tabela 13, onde também são apresentados os tipos de metodologia de análise, equipamentos utilizados e referências. Nessa etapa do estudo, o efluente obtido de acordo com esta seção foi denominado “ENE”.

Tabela 13. Metodologias de análise do efluente não-esterilizado (ENE) para o cultivo em regime contínuo de crescimento.

Parâmetro	Princípio do Método	Equipamento	Referência
pH	Potenciometria	InPro 4260 METTLER TOLEDO	APHA (2005) 4500-H ⁺ B
Oxigênio Dissolvido (OD)	Polarografia com membranas	InPro 6850i METTLER TOLEDO	APHA (2005) 4500-O G
Turbidez	Nefelometria	Turbidímetro 2100P, HACH	APHA (2005) 2130 B
Alcalinidade Total	Titulometria	-	APHA (2005) 2320 B
Série de Sólidos	Gravimetria	-	APHA (2005) 2540
Demanda Química de Oxigênio (DQO)	Colorimetria	Espectrofotômetro DR/2000, HACH	APHA (2005) 5220 D
Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK)	Titulometria	-	APHA (2005) 4500-N _{org} B
Nitrogênio Amoniacal (NH ₄ ⁺)	Titulometria	-	APHA (2005) 4500-NH ₃ C
Nitrato (NO ₃ ⁻)	Cromatografia Iônica	IC Basic Plus 883 -METROHM /Metrosep A Supp 5-150/4.0 (NaHCO ₃ 1 mM; Na ₂ CO ₃ 4 mM)	Kissner & Koppenol (1986)
Nitrito (NO ₂ ⁻)	Cromatografia Iônica	IC Basic Plus 883 -METROHM /Metrosep A Supp 5-150/4.0 (NaHCO ₃ 1 mM; Na ₂ CO ₃ 4 mM)	Kissner & Koppenol (1986)
Fósforo Total (PT)	Colorimetria	Espectrofotômetro DR/2000, HACH	APHA (2005) 4500-P E
Fosfato (PO ₄ ³⁻)	Cromatografia Iônica	IC Basic Plus 883 -METROHM /Metrosep A Supp 5-150/4.0 (NaHCO ₃ 1 mM; Na ₂ CO ₃ 4 mM)	Urasa & Ferede (1986)
Bactérias Heterotróficas Totais (BHT)	<i>Pour plate</i> e contagem	-	APHA (2005) 9215 B
Coliformes Totais (CT)	Substrato cromogênico	Cartelas Quanti-Tray/2000, IDEXX	APHA (2005) 9223 B
<i>Escherichia coli</i>	Substrato fluorogênico	Cartelas Quanti-Tray/2000, IDEXX	APHA (2005) 9223 B

6.1.2. Escolha e manutenção do inóculo

A cepa de microalga escolhida como inóculo para os cultivos em regime contínuo foi a *Chlorella* sp. L06, isolada do efluente de reator UASB. Essa cepa foi escolhida devido ao seu maior desempenho em crescimento, produtividade de biomassa, e remoção de nutrientes, quando comparada às outras cepas (Etapa 1). Ademais, sua maior concentração de clorofila *a in vivo* (Figura 11) em regime de batelada foi um indício da sua capacidade de crescer sob condições de auto-sombreamento, como as que ocorrem em densidades celulares elevadas.

De fato, espécies do gênero *Chlorella* já foram amplamente utilizadas para cultivos em diversos efluentes de sistemas de tratamento (WEN *et al.*, 2017; GONÇALVES *et al.*, 2016b; JEBALI *et al.*, 2015; GÓMEZ-SERRANO *et al.*, 2015), principalmente devido ao seu crescimento rápido e sua resiliência às condições adversas nesse tipo de meio (LV *et al.*, 2017). As culturas de *Chlorella* sp. L06 que foram empregadas como inóculo foram mantidas em tubos de ensaio com ENE, e só foram utilizadas quando estavam em fase exponencial de crescimento.

6.1.3. Equipamentos e condições experimentais do cultivo

Para cultivar *Chlorella* sp. L06 em regime contínuo de crescimento, foi utilizado um biorreator do tipo Perfeitamente Agitado (RPA) do modelo TEC-BIO-1,5 V-E2 (Tecnal), com volume útil de 1,2 L, agitação mecânica, termostatização por jaqueta d'água, e sensores de pH InPro 4260 e de oxigênio dissolvido InPro 6850i (METTLER TOLEDO). O software de controle do biorreator foi o BS-100 da BioSoft, que possibilitou a leitura e registro de dados em tempo real. Para promover a iluminação, foram utilizadas duas lâmpadas LED amarelas de 11 W de potência (Cristallux), que foram posicionadas em lados opostos do biorreator (Figura 13). A intensidade luminosa no cultivo foi

regulada através da distância entre as lâmpadas e o biorreator, e foi medida com um luxímetro (ITLD 260, Instrutemp) inserido no seu interior antes de cada experimento. Para se aplicar o fluxo contínuo foi utilizada uma bomba peristáltica dosadora (DosaTec 2 DM 5002, Provitec), com capacidade de 10 a 100 mL h⁻¹, e dois cabeçotes: um para injetar meio e outro para coletar o cultivo, na mesma vazão, com mangueiras de silicone. A Figura 13 mostra o sistema de cultivo contínuo de microalgas utilizado nesse estudo.



Figura 13. Sistema de cultivo de microalgas em regime contínuo de crescimento utilizado nesse estudo, com o biorreator (vazio) no centro, a bomba peristáltica no canto superior esquerdo, e o banho termostático no lado direito.

Fonte: autor.

O objetivo dessa etapa foi o de avaliar a influência da taxa de diluição sobre a produtividade e composição da biomassa, remoção de nutrientes e concentração de bioindicadores. Para tanto, cultivos em ENE foram realizados para cada uma das 6 taxas de diluição aplicadas (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; e 0,6 d⁻¹), que foram escolhidas com base na taxa específica de crescimento da *Chlorella* sp. L06. Antes de iniciar os cultivos, o

biorreator e as sondas foram desinfetados com solução de água com hipoclorito de sódio comercial, e depois lavados com água e secos em estufa a 60 °C. Após a montagem do sistema, o biorreator foi preenchido com ENE e o inóculo obtido, até atingir a absorbância de 0,1 (DO₇₅₀).

O volume do cultivo foi de 1,2 L, e as condições foram: luminosidade de aproximadamente 32.000 lux; fotoperíodo de 12 h:12 h (claro: escuro), com o período luminoso começando às 6:30; temperatura de 27 ± 1 °C, regulada pelo banho termostático; e agitação mecânica de 300 rpm. O sistema foi operado em regime de batelada até atingir o final da fase exponencial de crescimento, quando a bomba dosadora foi ligada e as taxas de diluição passaram a ser avaliadas. A bomba foi regulada com um temporizador para funcionar apenas durante o período luminoso, como fizeram Ruiz e colaboradores (2013). Esses processos foram repetidos para cada uma das taxas de diluição, e as vazões utilizadas são especificadas na Tabela 14. Assim como nos cultivos em batelada da Etapa 1, não foi aplicado nenhum tipo de aeração, suplementação de carbono ou controle de pH nos cultivos em regime contínuo.

Tabela 14. Taxas de diluição utilizadas nos cultivos, equivalência das taxas em TDH, e vazões aplicadas na bomba dosadora para atingir essas condições. O volume do reator foi de 1200 mL e a vazão foi aplicada somente durante o período luminoso.

Tempo de Detenção Hidráulica - TDH (d)	Taxa de Diluição - D (d ⁻¹)	Vazão da Bomba Dosadora (mL h ⁻¹)
1,67	0,6	60
2,00	0,5	50
2,50	0,4	40
3,33	0,3	30
5,00	0,2	20
10,00	0,1	10

6.1.4. Métodos analíticos

6.1.4.1. Monitoramento da biomassa e produtividade

Amostras dos cultivos foram coletadas diariamente para leitura da absorbância (DO₇₅₀) e fluorescência da clorofila *a in vivo*, e amostras para análise gravimétrica da concentração de biomassa (APHA, 2005; 2540 D) foram coletadas uma vez a cada dois dias. O pH e a saturação de oxigênio das culturas foi registrado em intervalos de 30 minutos com as sondas e o software utilizados. Os cultivos também foram monitorados por microscopia óptica, a fim de detectar possíveis mudanças em sua composição microbológica. A produtividade volumétrica em regime contínuo (PB_D; mg L⁻¹ d⁻¹) foi calculada de acordo com a Equação 11 (GRIFFITHS & HARRISON, 2009):

$$PB_D = X_D \times D \quad (11)$$

onde X_D é a concentração de biomassa dentro do biorreator em estado de crescimento equilibrado (*steady-state growth*), operando sob a taxa de diluição D (d⁻¹). Os estados de crescimento equilibrado foram definidos como a concentração constante de biomassa nos

cultivos (variação diária menor que 10%) por um período de no mínimo três tempos de retenção hidráulica, exceto quando a taxa de diluição foi de $0,1\text{ d}^{-1}$. Para o cálculo da produtividade, foi realizada uma média da concentração de biomassa dos três últimos dias do cultivo (JEBALI *et al.*, 2015; RUIZ *et al.*, 2013). A taxa de biofixação de CO_2 foi calculada com base no fator de conversão de 1,83 a partir da produtividade volumétrica de biomassa (ADAMCZYK *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2008; CHISTI, 2007).

6.1.4.2. Composição bioquímica da biomassa

No final de cada ciclo de cultivo, a biomassa foi separada da fase líquida por centrifugação a 4200 RCF (*Relative Centrifugal Force*) por 15 minutos, lavada duas vezes com água destilada, e seca em estufa a $103\text{ }^{\circ}\text{C}$ até peso constante. Os pellets resultantes de cada ciclo de cultivo foram pulverizados manualmente com pilão, e utilizados para todas as análises bioquímicas das biomassas (Figura 14).

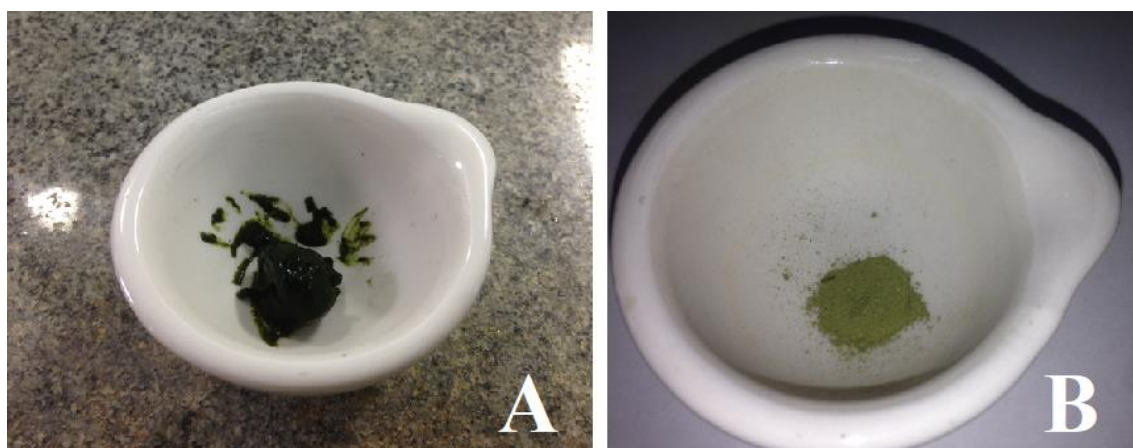


Figura 14. A) Exemplo de biomassa úmida de microalgas formada após a centrifugação; e B) exemplo de biomassa seca e pulverizada que foi usada para as análises bioquímicas.

Fonte: autor.

Para a determinação das concentrações de lipídeos totais (modificado de KOCHERT, 1978), 200 mg de biomassa pulverizada foram transferidas para cada tubo Falcon com 5 mL de água destilada, 5 mL de clorofórmio e 10 mL de metanol, e os tubos foram misturados intermitentemente por vórtice durante 5 minutos. Após a mistura, foram adicionados mais 10 mL de clorofórmio e 5 mL de solução de Na_2SO_4 (1,5%) e os frascos foram centrifugados a 4200 RCF por 10 minutos. Finalmente, a fase superior de cada frasco foi descartada, e a fase inferior, onde os lipídeos estavam dissolvidos, foi filtrada em membranas de fibra de vidro GF1 e transferida para béqueres previamente dessecados e pesados, para determinação gravimétrica.

Para analisar a concentração de proteínas na biomassa, o NTK desta foi determinado de acordo com a metodologia 4500- N_{org} B (APHA, 2005), e foi utilizado o fator de correção de NTK para proteínas de 5,95, que foi proposto por López e colaboradores (2010) especificamente para microalgas. O conteúdo de cinzas (sólidos fixos) na biomassa foi determinado através do método padrão 2540 E (APHA, 2005), e a concentração de carboidratos na biomassa foi estimada através da subtração das outras frações (lipídeos, proteínas e cinzas) de 100%, de acordo com Jebali e demais autores (2015).

6.1.4.3. Remoção de nutrientes e DQO

Amostras para a análise de nutrientes e DQO foram coletadas durante as fases de crescimento equilibrado por três dias consecutivos. Essas amostras foram filtradas em membrana de acetato de celulose (0.22 μm) e as fases líquidas foram analisadas, em triplicata, para os seguintes parâmetros: DQO; NTK; $\text{NH}_3\text{-N}$, $\text{NO}_3^-\text{-N}$, $\text{NO}_2^-\text{-N}$, PT, e

$\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$, de acordo com as metodologias contidas na Tabela 13. A eficiência de remoção (ER; %) foi calculada com base na seguinte equação:

$$\text{ER} = \frac{S_i - S_D}{S_D} \times 100 \quad (12)$$

onde S_i representa a concentração do substrato em questão no ENE e S_D representa a concentração na fase líquida da cultura em estado de crescimento equilibrado. A taxa de remoção (TR; $\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) para cada fração foi determinada de acordo com a Equação 13:

$$\text{TR} = \frac{S_i - S_D}{\text{HRT}} \quad (13)$$

Após a confirmação de que os valores de NTK e $\text{NH}_3\text{-N}$ foram praticamente iguais entre si, assim como fósforo total (PT) e $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$, foi optada a interrupção das análises de NTK e PT para a fase líquida.

6.1.4.4. Análise de bactérias heterotróficas, coliformes totais e *E. coli*

Amostras para análise de bactérias heterotróficas totais (BHT), coliformes totais (CT) e *E. coli* foram coletadas diretamente dos cultivos em estado de crescimento equilibrado, sem passar por nenhuma filtração, para evitar a subestimação dos valores devido à adsorção das bactérias à superfície celular das microalgas e ao filtro. As concentrações de cada análise foram comparadas com as respectivas concentrações iniciais para definir a eficiência de remoção (ER; %) de acordo com a seguinte equação:

$$\text{ER} = \frac{N_i - N_D}{N_i} \times 100 \quad (14)$$

onde N_i representa a concentração da bactéria em questão no ENE do início do cultivo, e N_D representa a concentração no estado de crescimento equilibrado sob a taxa de diluição D . Foi utilizada uma média de dados dos últimos três dias do crescimento equilibrado para determinar N_D , e cada análise foi feita em triplicata. Para determinar a constante de decaimento (k_d ; d^{-1}) da *E. coli* no sistema de cultivo, foi utilizada a seguinte equação (MARAIS, 1974):

$$k_d = \frac{\ln N_i - \ln N_D}{HRT} \quad (15)$$

onde N_i é o número mais provável (NMP 100 mL⁻¹) de *E. coli* no ENE inicial, e N_D é o NMP de *E. coli* do cultivo em estado de crescimento equilibrado sob a taxa de diluição D .

6.1.4.5. Análise do destino do nitrogênio no sistema

Para averiguar o destino do nitrogênio no sistema de cultivo contínuo, foi realizado um balanço de massa para esse elemento segundo a metodologia proposta por Sniffen e colaboradores (2018). O balanço levou em consideração as concentrações de NH_3-N , NO_3^-N , e NO_2^-N tanto na fase líquida quanto na fase sólida (biomassa) na entrada, no reator e na saída do sistema. Entretanto, as concentrações de formas nitrogenadas na fase gasosa não puderam ser mensuradas devido às limitações do equipamento de cultivo. Contudo, a comparação da taxa de remoção de nitrogênio do cultivo com a taxa de absorção de nitrogênio pela biomassa permitiu a estimação de possíveis perdas de nitrogênio no sistema pela fase gasosa. O balanço de massa de nitrogênio foi realizado de acordo com a fórmula geral:

$$T_{ac} = T_{aflu} - T_{eflu} + T_{ger} - T_{cons} \quad (16)$$

onde: T_{ac} é a taxa de acúmulo de NT (nitrogênio total) dentro do sistema; T_{afu} é a taxa de fluxo de NT para dentro do sistema; T_{efu} é a taxa de fluxo de NT para fora do contorno do sistema; T_{ger} é a taxa de geração de NT dentro do sistema; e T_{cons} é a taxa de consumo de NT pela biomassa, que foi calculada multiplicando a produtividade volumétrica pela concentração de N na biomassa.

6.1.5. Análise estatística

Os resultados foram expressos em médias com desvio padrão. Os dados foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey post-hoc, para determinar diferenças significativas entre as médias, com nível de significância de 0,05. O pacote de software utilizado foi o Paleontological Statistics (PAST v 3.14).

6.2. Resultados e discussão

6.2.1. Concentração de biomassa e produtividade em regime contínuo

Além de garantir um controle mais rigoroso das culturas, cultivos em regime contínuo resultam em maiores produtividades de biomassa, que podem ser alcançadas operando na taxa de diluição ideal, considerando a concentração de biomassa em cada caso (GEADA *et al.*, 2017). Entretanto, apenas cinco estados de crescimento equilibrado foram atingidos nesse estudo, pois ocorreu a lavagem (*washout*) do biorreator quando a taxa de diluição aplicada foi de $0,6 \text{ d}^{-1}$. Para título de exemplo, pode-se observar na Figura 15 o funcionamento do sistema sob a taxa de diluição $D = 0,3 \text{ d}^{-1}$ e $D = 0,2 \text{ d}^{-1}$.



Figura 15. Sistema de cultivo de *Chlorella* sp. L06 em regime de crescimento contínuo utilizando efluente não-esterilizado como meio. Na esquerda a taxa de diluição aplicada foi $0,3 \text{ d}^{-1}$ e na direita $0,2 \text{ d}^{-1}$.

Fonte: autor.

A seguir, a Figura 16 mostra a concentração de biomassa e a variação de produtividade para cada taxa de diluição aplicada ao sistema.

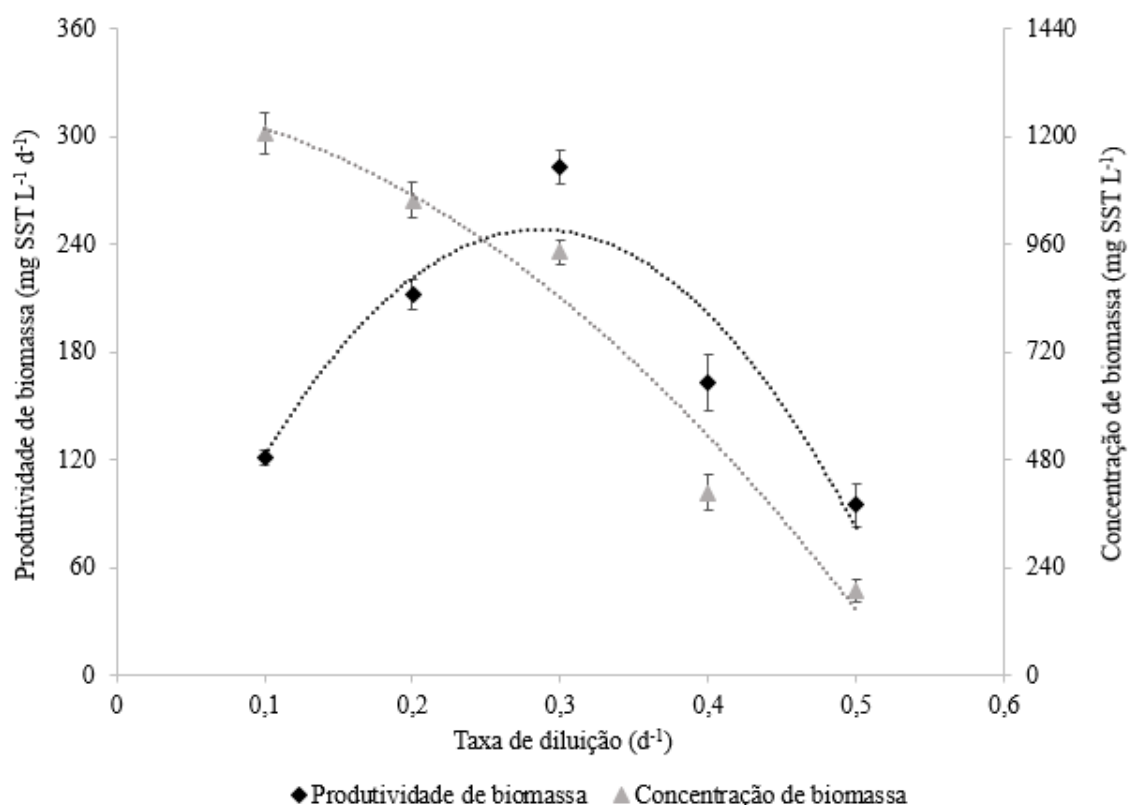


Figura 16. Variação na produtividade e concentração de biomassa de cultivos de *Chlorella* sp. L06 em regime de crescimento contínuo e diferentes taxas de diluição ($n = 6$ e $\pm DP$). Os dados previstos são representados por linhas de tendência polinomiais de segunda ordem.

Pode-se notar na Figura 16 que a concentração de biomassa diminuiu conforme a taxa de diluição aumentou, o que era esperado, e a redução mais drástica foi encontrada entre $D = 0,3\ d^{-1}$ ($943\ mg\ L^{-1}$) e $D = 0,4\ d^{-1}$ ($407\ mg\ L^{-1}$). Por outro lado, a produtividade de biomassa aumentou até $D = 0,3\ d^{-1}$, quando atingiu seu pico ($283\ mg\ L^{-1}\ d^{-1}$), e diminuiu, atingindo o menor valor ($95\ mg\ L^{-1}\ d^{-1}$) em $D = 0,5\ d^{-1}$. A maior produtividade de biomassa ($283\ mg\ L^{-1}\ d^{-1}$) foi aproximadamente quatro vezes maior que $71\ mg\ L^{-1}\ d^{-1}$ obtida em batelada para *Chlorella* sp. L06 (Tabela 11). De fato, a produtividade em modo contínuo foi sempre maior independentemente da taxa de diluição aplicada, o que poderia ser explicado pela biomassa estando em constante estado de crescimento exponencial (crescimento equilibrado). A produtividade máxima de biomassa obtida neste estudo é

similar às obtidas por McGinn e colaboradores (2012), que atingiram 234 e 267 mg L⁻¹ d⁻¹ cultivando *Scenedesmus* sp. AMDD em um quimiostato de bancada com D = 0,75 d⁻¹, usando efluente secundário desinfetado por UV, com injeção constante de CO₂.

Ruiz e demais autores (2013) conduziram um experimento similar, onde *Scenedesmus obliquus* SAG 276-10 foi cultivada em um fotobiorreator de placa plana usando efluente secundário não-esterilizado com injeção constante de CO₂ (5% v / v) e diferentes taxas de diluição, atingindo uma produtividade de 380 mg L⁻¹ d⁻¹ com D = 0,36 d⁻¹. González-Camejo e colaboradores (2018) também usaram efluente secundário não-esterilizado para cultivar microalgas, no entanto, usaram uma cultura mista dominada por *Scenedesmus* sp. como inóculo, obtendo uma produtividade de biomassa de 94 mg L⁻¹ d⁻¹ com D = 0,125 d⁻¹.

Por outro lado, alguns autores relataram taxas de produtividade consideravelmente maiores ao cultivar microalgas em outros tipos de efluentes com regime contínuo. Jebali e demais autores (2015) relataram uma taxa de produtividade de 900 mg L⁻¹ d⁻¹ cultivando *Scenedesmus* sp. WT6 em esgoto primário pré-tratado e não-esterilizado com D = 0,6 d⁻¹, enquanto Li e colaboradores (2011) alcançaram uma produtividade de 920 mg L⁻¹ d⁻¹ cultivando *Chlorella* sp. semi-continuamente em efluente autoclavado de desaguamento de lodo com D = 0,5 d⁻¹. No entanto, a concentração de nitrogênio e fósforo nos efluentes utilizados por esses pesquisadores foi consideravelmente maior que a do presente estudo, o que, combinado à iluminação contínua e ao influxo constante de CO₂, poderia ter contribuído para a manutenção de altas concentrações de biomassa. No entanto, sabe-se que altos teores de nutrientes no meio de cultivo não necessariamente resultam em alta concentração de biomassa de microalgas, considerando que altas concentrações de amônia (>100 mg L⁻¹) são geralmente tóxicas para a maioria das microalgas, particularmente quando os níveis de pH estão acima de 9,0 (ACIÉN *et al.*, 2016). Não

obstante, os resultados de produtividade obtidos no presente estudo são compatíveis com muitos estudos publicados sobre o cultivo contínuo de microalgas utilizando efluentes secundários como meio, segundo a meta-análise mais recente sobre o assunto (LV *et al.*, 2017).

6.2.2. Taxas de remoção de nutrientes e DQO

Amostras dos cultivos em estado de crescimento equilibrado foram filtradas (0,22 μm) e as fases líquidas foram analisada para $\text{NH}_3\text{-N}$, $\text{NO}_3^-\text{-N}$, $\text{NO}_2^-\text{-N}$, $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$, e DQO, para determinar as taxas de remoção de nutrientes em cada taxa de diluição aplicada ao sistema. A Tabela 15 fornece os valores absolutos para nutrientes na entrada do sistema (entrada) e na fase líquida de cada estado de crescimento equilibrado (saída). Diferentes lotes de ENE foram utilizados ao longo dos experimentos em modo contínuo, e sua composição apresentou pequenas variações, conforme apresentado na Tabela 15.

Tabela 15. Médias das concentrações de nutrientes e demanda química de oxigênio (DQO) na entrada e saída do sistema de cultivo de *Chlorella* sp. L06 em crescimento contínuo e diferentes taxas de diluição (n = 6). Eficiências de remoção (ER; %) para NT, PO₄³⁻ e DQO também foram fornecidas.

Parâmetro	Unidade	Taxa de diluição (d ⁻¹)				
		0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
NT (entrada)	mg L ⁻¹	39,8	43,8	42,2	40,4	43,5
NT (saída)	mg L ⁻¹	1,9	2,0	3,1	7,8	21,1
ER de NT	%	95,2	95,4	92,6	80,7	51,6
NH ₃ ⁺ (entrada)	mg L ⁻¹	39,3	43,5	41,6	40,0	42,7
NH ₃ ⁺ (saída)	mg L ⁻¹	1,0	1,0	2,1	7,1	20,2
NO ₃ ⁻ (entrada)	mg L ⁻¹	0,47	0,32	0,58	0,37	0,71
NO ₃ ⁻ (saída)	mg L ⁻¹	0,89	0,95	0,94	0,76	0,85
NO ₂ ⁻ (entrada)	mg L ⁻¹	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
NO ₂ ⁻ (saída)	mg L ⁻¹	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
PO ₄ ³⁻ (entrada)	mg L ⁻¹	4,80	5,20	4,43	4,21	4,02
PO ₄ ³⁻ (saída)	mg L ⁻¹	0,20	0,23	0,31	0,79	1,21
ER de PO ₄ ³⁻	%	95,8	95,6	93,1	81,2	69,5
DQO (entrada)	mg L ⁻¹	96,5	110,4	90,7	88,5	108,6
DQO (saída)	mg L ⁻¹	5,4	6,8	9,5	19,6	60,8
ER de DQO	%	94,7	93,8	89,4	77,8	44,7

N.D. = não detectado.

Em relação à DQO, sua concentração inicial variou de 88 a 110 mg O₂ L⁻¹, que já estava abaixo das exigências de lançamento (120 mg O₂ L⁻¹ para DBO₅), conforme a legislação brasileira CONAMA 430/2011. No entanto, o sistema foi capaz de reduzir a DQO solúvel em todas as taxas de diluição testadas, variando de 44% de redução (D = 0,5 d⁻¹) a acima de 90% (D = 0,1 e 0,2 d⁻¹). Isso pode ser atribuído à alta geração de O₂ pela atividade fotossintética dentro do reator, o que poderia aumentar a oxidação da matéria orgânica pelas bactérias nativas. Alternativamente, a remoção de alta DQO em

regime contínuo pode indicar nutrição mixotrófica das microalgas, como discutido por Park e colaboradores (2011). A adsorção pela biomassa e/ou membrana do filtro também pode ter desempenhado um papel na remoção de DQO, uma vez que uma fração da DQO é frequentemente recalcitrante, portanto, difícil de se assimilar biologicamente. Jebali e demais autores (2015) relataram uma redução impressionante de DQO de 1180 para 73 mg O₂ L⁻¹ ao cultivar *Scenedesmus* sp. em efluente primário pré-tratado e não-esterilizado com $D = 0,6 \text{ d}^{-1}$, enquanto Ruiz e colaboradores (2013) conduziram um experimento semelhante com efluente secundário desinfetado com UV e a concentração de DQO no reator permaneceu inalterada para todas as taxas de diluição aplicadas.

Em relação ao NT e PT, a concentração inicial nos diferentes lotes de efluente utilizados variou de 39,8 a 43,5 mg N L⁻¹ e de 4,02 a 5,20 mg P L⁻¹, respectivamente (Tabela 15). De acordo com a legislação brasileira CONAMA 430/2011, o nitrogênio amoniacal nos efluentes deve estar abaixo de 20 mg L⁻¹ para atender aos parâmetros de lançamento, e atualmente não há restrições para lançamento de fósforo, ao menos em nível nacional. No entanto, uma redução significativa de NT e PT foi observada para todas as taxas de diluição. A maior redução de NT (de 43,8 para 2,0 mg L⁻¹) e de PT (de 5,20 para 0,23 mg L⁻¹) foram obtidas em $D = 0,2 \text{ d}^{-1}$. Independentemente da taxa de diluição testada, todas as concentrações finais de NT e PT na fase líquida cumpriram com a legislação brasileira para lançamento. Além disso, se os limites da Diretriz do Conselho da União Europeia 91/271/EEC fossem usados como referência (10 mg N L⁻¹ e 1 mg P L⁻¹), somente a fase líquida de $D = 0,5 \text{ d}^{-1}$ não seria compatível.

Quando se lida com o tratamento de efluentes em modo contínuo, a comparação da concentração inicial e final de contaminantes pode ser insuficiente para fornecer uma avaliação do desempenho geral do sistema. A taxa de diluição deve ser considerada nos processos de tomada de decisão, uma vez que altas taxas de diluição são preferidas para

tratamento em escala real, devido a razões econômicas. Portanto, os resultados podem ser melhor expressos como taxas de remoção ($\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$) em vez de redução nos valores absolutos ou porcentagens de redução. A Figura 17 representa as taxas de remoção de NT e PT para todas as taxas de diluição testadas.

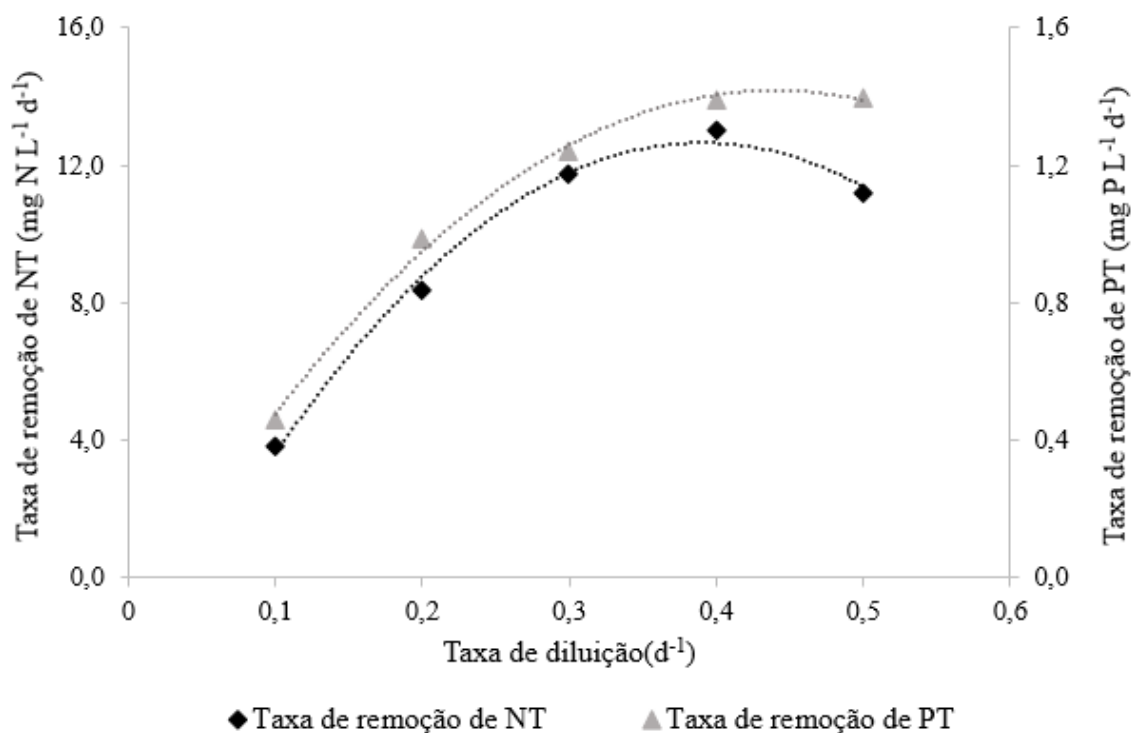


Figura 17. Variação nas médias das taxas de remoção de NT e PT em cultivos de *Chlorella* sp. L06 com regime de crescimento contínuo e diferentes taxas de diluição. Os dados previstos são representados por linhas de tendência polinomiais de segunda ordem ($n = 6$).

Foi observada uma tendência para ambos os parâmetros, onde as taxas de remoção foram diretamente proporcionais à taxa de diluição aplicada, exceto quando D foi de $0,5 \text{ d}^{-1}$. Isso corrobora a hipótese de que operar com altas taxas de diluição é a melhor prática para o tratamento de efluentes. A maior taxa de remoção de NT ($13 \text{ mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$), obtida em $D = 0,4 \text{ d}^{-1}$, foi semelhante à taxa de $13,5 \text{ mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ obtida por Ruiz e colaboradores (2013) com $D = 0,9 \text{ d}^{-1}$. Em relação às taxas de remoção de PT, a tendência seguiu um

padrão semelhante quando comparado ao NT (Figura 17). No entanto, a taxa não diminuiu quando a taxa de diluição foi de $0,5 \text{ d}^{-1}$, o que é consistente com o fato de que as microalgas absorvem proporcionalmente mais fósforo do que o nitrogênio, apesar da maior necessidade de nitrogênio (REDFIELD, 1958). Isso pode indicar um consumo de luxo de fósforo, como foi discutido por Elrifi e Turpin (1985). Por outro lado, uma vez que os níveis de pH das culturas foram sempre superiores a 9,0 e a saturação de oxigênio dissolvido excedeu os 200% em todos os casos, é provável que também tenha ocorrido precipitação química do fósforo. A maior taxa de remoção de TP ($1,4 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) foi obtida com $D = 0,4$ e $D = 0,5 \text{ d}^{-1}$, o que se enquadra na faixa de resultados obtida por McGinn et al. (2012), Ruiz et al. (2013), Jebali et al. (2015), e é drasticamente menor que $85,0 \text{ mg P L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ relatado por Li et al. (2011), que usaram efluentes de desaguamento de lodo como meio de cultivo.

Em termos de tratamento terciário, podemos concluir que nitrogênio, fósforo e DQO foram eficientemente removidos da fase líquida do efluente ao longo dos experimentos em modo contínuo, independentemente da taxa de diluição aplicada ao sistema. As maiores taxas de remoção de NT e TP foram alcançadas em $D = 0,4 \text{ d}^{-1}$, o que equivale a um tempo de retenção hidráulica (TDH) de 2,5 dias. Adicionalmente, é crucial enfatizar que isto foi obtido sem exercer controle sobre o pH ou o carbono inorgânico dissolvido das culturas, diferentemente da maioria dos estudos (LV *et al.*, 2017).

6.2.3. Destino do nitrogênio

Em relação ao destino do nitrogênio do sistema, foi realizado um balanço deste elemento na fase líquida e sólida dos cultivos. Para melhor visualização, a Figura 18

compara as taxas de remoção deste elemento pelo sistema com as taxas de absorção de N pela biomassa.

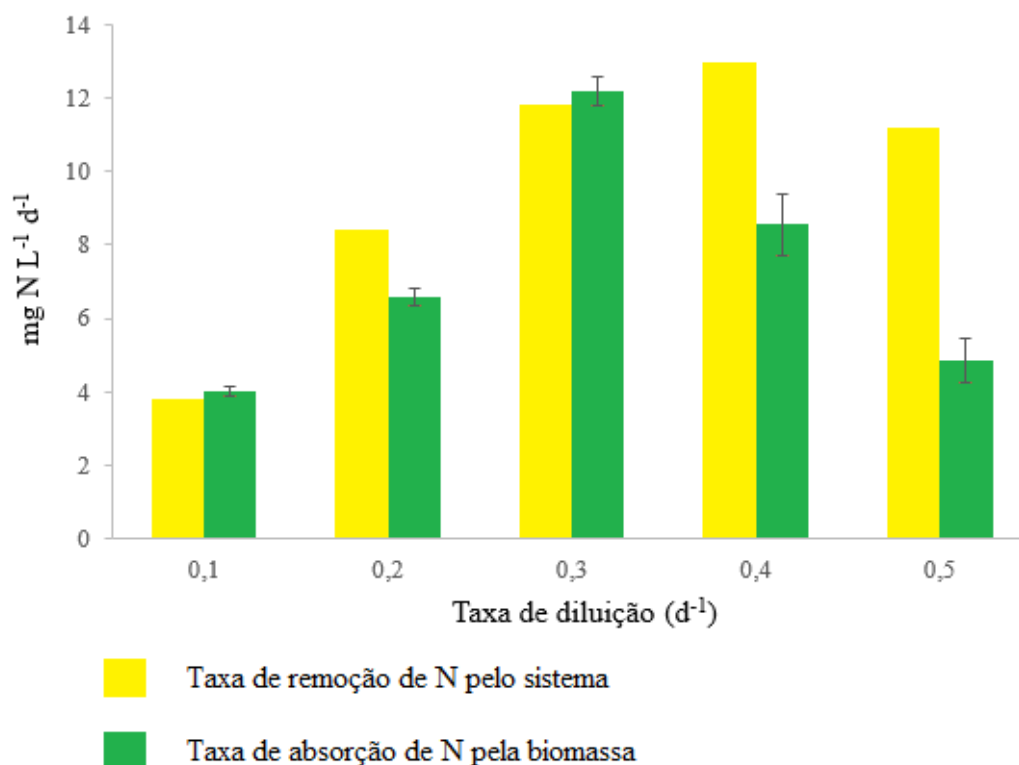


Figura 18. Comparação da taxa de remoção de N pelo sistema com a taxa de absorção de N pela biomassa para cada taxa de diluição aplicada ($n = 3$ e \pm DP).

Pode-se observar nessa figura que, quando as taxas de diluição foram 0,4 e 0,5 d⁻¹, a taxa de remoção de N pelo sistema superou a taxa de absorção de N pela biomassa de microalgas. Essa diferença foi interpretada como a remoção de nitrogênio por meios abióticos, como o *stripping* da amônia. Provavelmente isso ocorreu em menor grau com taxas de diluições menores, pois as médias de pH e saturação de O₂ entre as taxas de diluição não apresentaram diferenças significativas entre si. Entretanto, condições com taxas de diluição menores podem ser consideradas como promotoras de estresse nutricional, visto que não há um suprimento constante de nutrientes como ocorre com

taxas de diluição maiores. Por outro lado, taxas de diluição maiores não permitem que a concentração de nutrientes esteja baixa em um dado momento sob crescimento equilibrado, portanto os mecanismos abióticos (e.g. pH) têm a “chance” de volatilizar a amônia e removê-la da fase líquida nesses casos.

6.2.4. Remoção/inativação de bactérias e bioindicadores

A Tabela 16 mostra os valores absolutos para bactérias heterotróficas totais (BHT; UFC mL⁻¹), coliformes totais (CT; NMP 100 mL⁻¹) e *E. coli* (NMP 100 mL⁻¹) na entrada do sistema (entrada) e no cultivo durante cada estado de crescimento equilibrado (saída). Diferentes lotes de ENE foram utilizados nos experimentos em modo contínuo, e sua composição microbiológica apresentou variações, conforme apresentado na Tabela 16.

Tabela 16. Médias das concentrações de bactérias heterotróficas totais (BHT; UFC mL⁻¹), coliformes totais (CT; NMP 100 mL⁻¹) e *E. coli* (NMP 100 mL⁻¹) na entrada e saída do sistema de cultivo de *Chlorella* sp. L06 em crescimento contínuo e diferentes taxas de diluição (n = 6 e \pm DP).

Parâmetro	Unidade	Taxa de diluição (d ⁻¹)				
		0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
BHT (entrada)	UFC mL ⁻¹	(7,8 \pm 1,9) $\times 10^8$	(1,1 \pm 0,2) $\times 10^9$	(7,6 \pm 1,7) $\times 10^8$	(8,3 \pm 1,0) $\times 10^8$	(1,4 \pm 0,6) $\times 10^9$
BHT (saída)	UFC mL ⁻¹	(9,2 \pm 2,5) $\times 10^4$	(9,5 \pm 0,9) $\times 10^4$	(1,2 \pm 0,3) $\times 10^5$	(1,0 \pm 0,1) $\times 10^6$	(3,4 \pm 2,1) $\times 10^7$
CT (entrada)	NMP 100 mL ⁻¹	(1,1 \pm 0,2) $\times 10^7$	(4,1 \pm 1,3) $\times 10^7$	(1,1 \pm 0,1) $\times 10^7$	(1,2 \pm 0,2) $\times 10^7$	(5,6 \pm 0,7) $\times 10^7$
CT (saída)	NMP 100 mL ⁻¹	(1,9 \pm 0,1) $\times 10^3$	(2,0 \pm 0,1) $\times 10^3$	(2,5 \pm 0,4) $\times 10^3$	(1,7 \pm 0,2) $\times 10^4$	(3,9 \pm 1,3) $\times 10^5$
<i>E. coli</i> (entrada)	NMP 100 mL ⁻¹	(7,3 \pm 0,5) $\times 10^6$	(9,2 \pm 0,8) $\times 10^6$	(7,4 \pm 1,0) $\times 10^6$	(8,7 \pm 0,8) $\times 10^6$	(9,3 \pm 0,3) $\times 10^6$
<i>E. coli</i> (saída)	NMP 100 mL ⁻¹	(2,7 \pm 0,5) $\times 10^2$	(3,3 \pm 0,5) $\times 10^2$	(3,9 \pm 0,4) $\times 10^2$	(7,6 \pm 1,3) $\times 10^3$	(6,2 \pm 2,0) $\times 10^4$

Todas as taxas de diluição aplicadas ao sistema resultaram em redução expressiva da comunidade heterotrófica. Para bactérias heterotróficas totais, a remoção foi superior a 99% para todas as taxas de diluição, exceto para D = 0,5 d⁻¹, quando foi de 98%. A remoção de coliformes totais (CT) e *E. coli* excedeu 99%, independentemente da taxa de diluição. Apesar do potencial efeito simbiótico entre microalgas e bactérias heterotróficas em culturas binárias (RASHID *et al.*, 2018), as condições ambientais relacionadas ao crescimento de algas têm sido relatadas como desfavoráveis à persistência de coliformes

(GUTIÉRREZ-ALFARO *et al.*, 2018). Posadas e demais autores (2015) alcançaram remoções de *E. coli* superiores a 80% utilizando LATs circulares ao ar livre operando com $D = 0,35$ e $0,37 \text{ d}^{-1}$ em diferentes pontos de controle de pH, e relataram maiores concentrações de *E. coli* em pH menores, confirmando um efeito positivo do alto pH na inativação de *E. coli*.

De fato, ao longo dos experimentos em modo contínuo, os valores de pH permaneceram acima de 10,0 e não variaram entre as diferentes taxas de diluição testadas. Embora os resultados de coliformes tenham mostrado menor redução logarítmica com $D = 0,4$ e $0,5 \text{ d}^{-1}$ (3 e 2 unidades de log, respectivamente), foram obtidas maiores taxas de decaimento de *E. coli*, quando comparadas com taxas de diluição mais baixas (Figura 19).

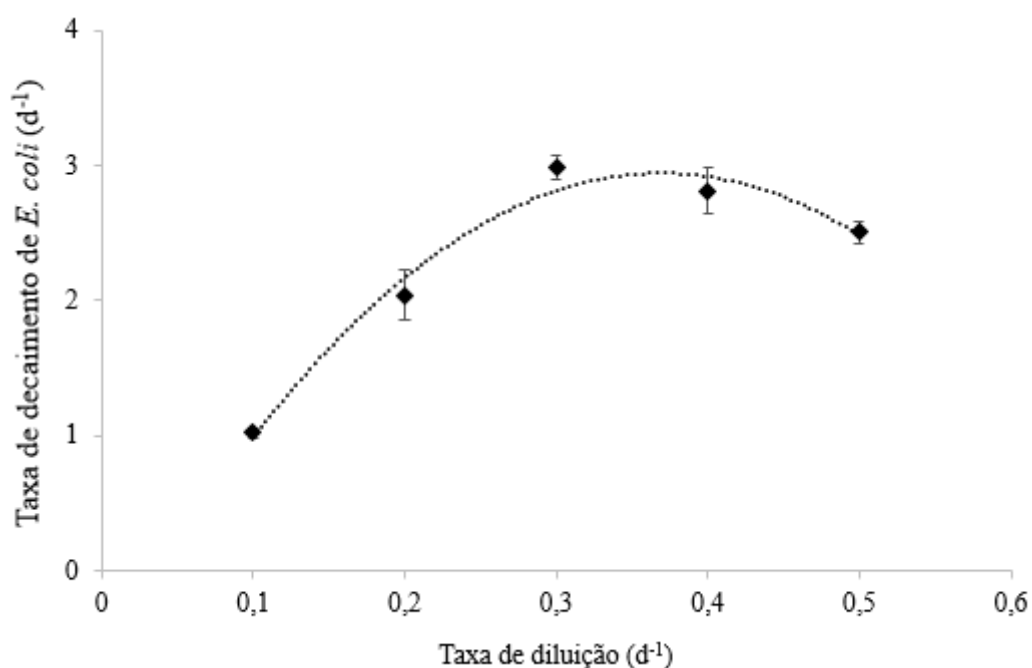


Figura 19. Taxas de decaimento de *E. coli* em cultivo de *Chlorella* sp. L06 sob crescimento contínuo e diferentes taxas de diluição ($n = 6$ e $\pm \text{SD}$). Os dados previstos são representados por linhas de tendência polinomiais de segunda ordem.

A maior redução logarítmica observada para taxas de diluição menores (Tabela 16) pode ter sido o resultado de um aumento do TDH combinado com pH elevado no sistema, contribuindo para a inativação de *E. coli*. As maiores concentrações de biomassa que ocorreram em taxas de diluição menores poderiam também ter contribuído para a redução da concentração de bactérias, uma vez que as microalgas são capazes de produzir exotoxinas que atuam como antimicrobianos para muitos microrganismos, incluindo coliformes fecais (UNNITHAN *et al.*, 2014). Além disso, a alta saturação de O₂ nas culturas pode ter contribuído para a inativação dos coliformes. Conclusivamente, embora a maior redução em log de *E. coli* tenha sido obtida com baixas taxas de diluição (0,1 e 0,2 d⁻¹), a taxa de decaimento foi maior com D = 0,3, 0,4 e 0,5 d⁻¹ (Figura 19).

Em relação à DQO, sua concentração inicial já estava abaixo dos requisitos de descarga neste experimento. Contudo, foi discutido por Lee e colaboradores (2015) que as bactérias desempenham um papel importante na remoção de carbono orgânico dissolvido em cultivos binários de microalgas e bactérias, e seria razoável concluir que parte da remoção de DQO foi o resultado da oxidação bacteriana ao invés do metabolismo heterotrófico ou mixotrófico de microalgas. Como último ponto, um sistema com crescimento balanceado entre microalgas e bactérias é sugerido como uma alternativa para a produção de biomassa ligada ao tratamento de efluentes.

6.2.5. Composição bioquímica da biomassa

A composição bioquímica da biomassa foi analisada no estado equilibrado de crescimento para cada taxa de diluição aplicada, e os resultados estão representados na Figura 20.

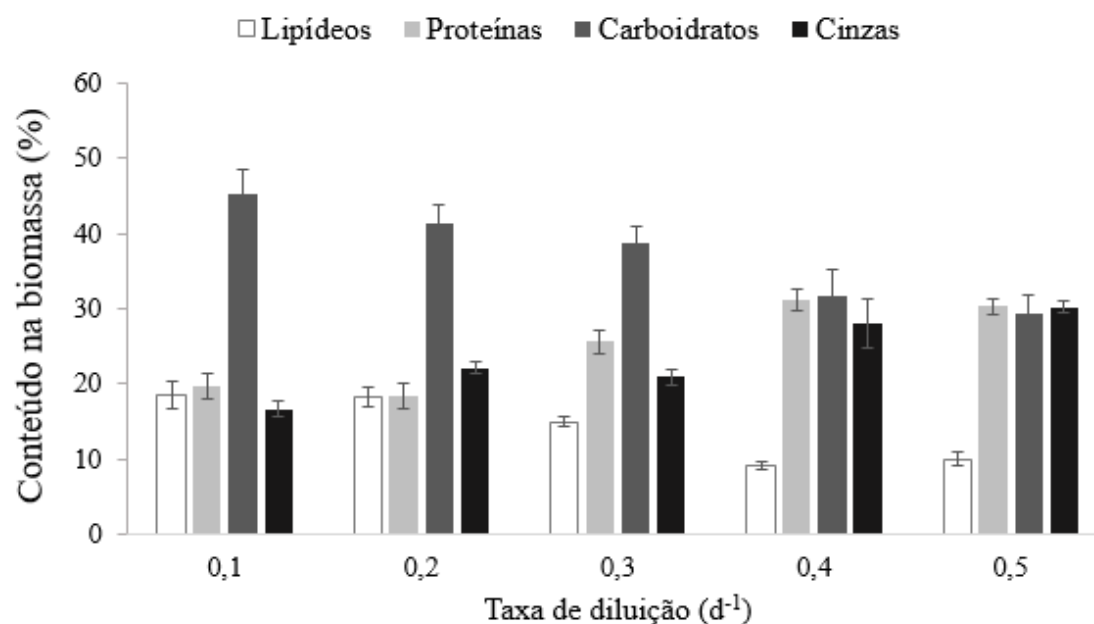


Figura 20. Composição bioquímica da biomassa seca de *Chlorella* sp. L06 sob crescimento contínuo e diferentes taxas de diluição ($n = 3$ e \pm SD).

Sabe-se que a composição da biomassa das microalgas varia de acordo com a composição dos meios, e em culturas contínuas, a taxa de diluição desempenha um papel essencial na determinação do perfil bioquímico da biomassa (McGINN *et al.*, 2012). Os carboidratos foram a maior fração da biomassa seca quando a taxa de diluição foi de 0,1, 0,2 e 0,3 d⁻¹ e, nas maiores taxas de diluição, os teores de carboidratos, proteínas e cinzas foram estatisticamente iguais. À medida que a taxa de diluição aumentou, o conteúdo de carboidratos apresentou uma aparente diminuição, no entanto não houve diferenças significativas para as diferentes taxas de diluição testadas. Carboidratos são compostos ricos em energia, que geralmente são sintetizados por microalgas em condições de estresse, como a carência de nutrientes (MARKOU *et al.*, 2012).

Baixas taxas de diluição podem ser estressantes para as microalgas de crescimento rápido, uma vez que os nutrientes no meio são rapidamente assimilados pela biomassa e não são repostos na taxa necessária, potencialmente desencadeando vias metabólicas para

o armazenamento de energia. Essa lógica também pode ser aplicada aos lipídeos, e no presente estudo, uma diferença significativa foi encontrada entre o conteúdo lipídico da biomassa em menores (0,1, 0,2 e 0,3 d⁻¹) e maiores (0,4 e 0,5 d⁻¹) taxas de diluição, sendo as primeiras maiores que a segundas. Isso pode indicar que taxas de diluição mais baixas promovem condições estressantes no sistema, resultando em uma biomassa com maior porcentagem de substâncias de armazenamento de energia.

Por outro lado, quando as microalgas crescem sob condições não-estressantes de nutrientes, elas tendem a acumular proteínas ao invés de carboidratos ou lipídios (GÓMEZ *et al.*, 2013). Altas taxas de diluição tendem a repor os nutrientes das culturas rapidamente, resultando em um ambiente onde as microalgas podem crescer sem estresse nutricional. Os resultados aqui obtidos corroboram com isso, uma vez que o teor de proteína na biomassa foi significativamente maior quando a taxa de diluição foi de 0,3, 0,4 e 0,5 d⁻¹, quando comparada a 0,1 e 0,2 d⁻¹ (Figura 20).

Em relação aos processos de transformação de biomassa em bioenergia, o alto teor de proteína (baixas razões C:N) é frequentemente desfavorável, particularmente para a digestão anaeróbia, considerando os efeitos inibitórios que a amônia tem sobre as metanoarqueas (FRICKE *et al.*, 2007). Em termos de teor de cinzas, a biomassa produzida com D = 0,4 e 0,5 d⁻¹ apresentou maior porcentagem quando comparada com o restante. Isso poderia ser explicado pelo fato de que elementos formadores de cinzas ocorrem na biomassa principalmente como sais ligados à estrutura de carbono (SUKARNI *et al.*, 2014), e em taxas de diluição elevadas, a biomassa assimila proporcionalmente mais sais, quando comparada às condições impostas por taxas de diluição baixas.

7. CONCLUSÕES GERAIS E RECOMENDAÇÕES

Foi demonstrado que todos os isolados de microalgas, bem como o inóculo misto, foram capazes de crescer em regime de batelada, juntamente com bactérias nativas em efluente secundário não-esterilizado, sem borbulhamento de ar, controle de pH ou suplementação de CO₂. A cepa autóctone *Chlorella* sp. L06 apresentou maior taxa de crescimento, produtividade de biomassa, e remoção de nutrientes quando comparada a outros isolados em batelada.

Com relação aos experimentos em modo contínuo, foi possível cultivar *Chlorella* sp. L06 e atingir 5 estados de crescimento equilibrado que, no entanto, só foram mantidos por no máximo 14 dias. Em relação à produtividade volumétrica de biomassa, uma máxima de 283 mg L⁻¹ d⁻¹ foi alcançada com uma taxa de diluição de 0,3 d⁻¹, um valor 4 vezes maior do que o atingido em regime de batelada. Ademais, esse valor foi comparável com os de estudos similares, apesar de não ter sido aplicado no presente estudo nenhum tipo de controle de pH ou suplementação de CO₂. Em relação à composição bioquímica das biomassas produzidas sob diferentes taxas de diluição, taxas menores (0,1, 0,2 e 0,3 d⁻¹) promoveram o armazenamento de componentes ricos em energia (carboidratos e lipídeos), com teor de lipídios de 15 a 19%. Por outro lado, taxas de diluição maiores promoveram maior produção de proteínas, o que poderia ser um empecilho para a posterior digestão anaeróbia desta biomassa.

Em relação ao tratamento terciário, maiores taxas de diluição (0,4 e 0,5 d⁻¹) promoveram maiores taxas de remoção de nutrientes, com máxima remoção de nitrogênio (13,0 mg NT L⁻¹ d⁻¹) e fósforo (1,4 mg PO₄³⁻-P L⁻¹ d⁻¹) obtidas com D = 0,4 d⁻¹. Isso corrobora com a tese de que operar com taxas maiores de diluição é uma boa prática no tratamento de efluentes por microalgas. No que diz respeito ao destino do nitrogênio nesse

sistema, os resultados sugeriram que mecanismos abióticos de remoção (e.g. *stripping* da amônia) foram responsáveis por um terço da remoção total quando a taxa de diluição foi de $0,4\text{ d}^{-1}$ e por metade da remoção quando a taxa foi de $0,5\text{ d}^{-1}$. Para a inativação/remoção de coliformes totais e *E. coli*, a taxa de diluição $0,4\text{ d}^{-1}$ também propiciou melhores resultados, quando comparados com taxas menores.

De uma maneira geral, os resultados sugerem que a escolha das taxas de diluição para o cultivo de microalgas deve ser feita levando-se em conta os objetivos do cultivo e o custo-benefício, quando a produção de biomassa e o tratamento terciário são desejados. Se o foco for a produção de biomassa para extração de lipídeos e/ou digestão anaeróbia, taxas de diluição menores promoveriam uma maior porcentagem de lipídeos e carboidratos, apesar de resultarem em menor produtividade de biomassa. Se o objetivo for o polimento do efluente, taxas de diluição maiores promoveriam em maiores taxas de remoção de nutrientes e *E. coli*.

Em relação às recomendações para futuros estudos, talvez a mais importante seja a ampliação da escala de cultivo, principalmente para validar/refutar os resultados aqui obtidos em escala de bancada, a fim de elaborar modelos realísticos com aplicação na engenharia sanitária. A manutenção do cultivo por períodos maiores também é um desafio em condições ambientais não controladas, visto que as variações ambientais influenciam na produtividade de biomassa e tratamento terciário do efluente. As interações entre os diferentes microrganismos do cultivo – principalmente entre bactérias e microalgas – merecem um destaque nos futuros estudos de microbiologia aplicada ao saneamento. Como último ponto, recomenda-se a realização de pesquisas visando à otimização dos cultivos contínuos através da suplementação com carbono inorgânico proveniente de fontes alternativas (e.g. gases de combustão; CaCO_3).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RAOUF, N., AL-HOMAIDAN, A. A., IBRAHEEM, I. B. Microalgae and wastewater treatment. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 19, p. 257-275, 2012.

ACIÉN, F. G.; GÓMEZ-SERRANO, C.; MORALES-AMARAL, M. M.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, S. M.; MOLINA-GRIMA, E. Wastewater treatment using microalgae: how realistic a contribution might it be to significant urban wastewater treatment? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 9013-9022, 2016.

ACIÉN-FERNÁNDEZ, F. G.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M.; MOLINA-GRIMA, E. Photobioreactors for the production of microalgae. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 12, p. 131-151, 2013.

ADAMCZYK, M.; LASEK, J.; SKAWINSKA, A. CO₂ biofixation and growth kinetics of *Chlorella vulgaris* and *Nanochloropsis gaditana*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 179, n. 7, p. 1248-1261, 2016.

ALLEN, M. M. Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. **Journal of Phycology**, v. 4, p. 1-4, 1968.

ANDERSEN, R. A.; KAWACHI, M. Traditional microalgae isolation techniques. In: **Algal Culturing Techniques**. ANDERSEN, R. A. (ed.). London: Elsevier Academic Press, p. 83-101, 2005.

ANDRADE, D. S.; DA SILVA, M. R. L.; SCHERER, A.; CARDOSO, J. D. Características dos principais grupos de microalgas de águas continentais. In: **Microalgas de águas continentais**. ANDRADE, D. S.; FILHO, A. C. (eds.). Londrina: IAPAR, 2014.

ANDRADE NETO, C. O.; CAMPOS, J. R. Capítulo 1: Introdução. In: **Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo**. CAMPOS, J. R. (coordenador). Rio de Janeiro: PROSAB/FINEP, 1999. p. 1-28.

APHA, AWWA, WPCF. **Standard methods for the examination of waters and wastewaters**. 21st ed. Washington (DC): American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environmental Federation; 2005.

- ARITA, C. E. Q.; PEEBLES, C.; BRADLEY, T. H. Scalability of combining microalgae-based biofuels with wastewater facilities: a review. **Algal Research**, v. 9, p. 160-169, 2015.
- ARIAS, D. M.; SOLÉ-BUNDÓ, M.; GARFÍ, M.; FERRER, I.; GARCÍA, J.; UGGETTI, E. Integrating microalgae tertiary treatment into activated sludge systems for energy and nutrients recovery from wastewater. **Bioresource Technology**, v. 274, p. 513-519, 2018.
- AZOV, Y.; GOLDMAN, J. C. Free ammonia inhibition of algal photosynthesis in intensive cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, p. 735-739, 1982.
- BABA, M.; SHIRAIWA, Y. High CO₂ response mechanisms in microalgae. **Advances in Photosynthesis – Fundamental Aspects**, v. 2, p. 299-320, 2007.
- BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. **Algae: anatomy, biochemistry and biotechnology**. New York: CRC Press. 2006.
- BECKER, E.W. Oil production. In: **Microalgae: biotechnology and microbiology**. BADDILEY, J. (ed.). Cambridge University Press: Cambridge-New York. 1994.
- BICUDO, C.E.; MENEZES, M. **Gêneros de Algas de águas continentais do Brasil: Chave para Identificação e Descrições**. São Paulo: RiMa, 2005. 502p.
- BOROWITZKA, M. A. Limits to growth. In: **Wastewater treatment with algae**. WONG, Y. S.; TAM, N. F. Y. (eds.). Springer Verlag, 1998. p. 203–226.
- BRASIL. Diagnóstico dos serviços de Água e Esgotos – 2015. In: Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS). Ministério das Cidades, Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental – SNSA. SNSA/MCIDADES, Brasília, 2017. 212 p.
- BRASIL. Resolução CONAMA n°430, de 13 de maio de 2011. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional de Meio Ambiente – CONAMA. Diário Oficial da União. Brasília, 2011.
- BRASIL, B. S.; SILVA, F. C.; SIQUEIRA, F. Microalgae biorefineries: the Brazilian scenario in perspective. **New Biotechnology**, v. 39, p. 90-98, 2017.
- BRENNAN, L., OWENDE, P. Biofuels from microalgae: A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 557-577, 2010.

CAI, T.; PARK, S. Y.; LI, Y. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 19, p. 360-369, 2013.

CAMACHO, F.; MOLINA, E.; MARTÍNEZ, M. E.; SÁNCHEZ, S.; GARCÍA, F. Continuous culture of the marine microalga *Tetraselmis* sp. productivity analysis. **Aquaculture**, v. 91, p. 75-84, 1990.

CAVALCANTI, P. F. F.; HAANDEL, A. VAN; KATO, M. T.; SPERLING, M. VON; LUDUVICE, M. L.; MONTEGGIA, L. O. Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios por lagoas de polimento. In: **Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios**, CHERNICHARO, C. A. L. (coord.). Projeto PROSAB, Belo Horizonte [s.n.]. cap. 3, p. 105- 170.

CHEN, G., ZHAO L., QI, Y. Enhancing the productivity of microalgae cultivated in wastewater toward biofuel production: A critical review. **Applied Energy**, v. 137, p. 282-291, 2015.

CHERNICHARO, C. A. L.; VAN HAANDEL, A.; FORESTI, E.; CYBIS, L. F. Capítulo 1: Introdução. In: **Pós-tratamento de Efluentes de Reatores Anaeróbios**. CHERNICHARO, C. A. L. (coordenador). Rio de Janeiro: PROSAB/FINEP, 2001.

CHI, Z.; O'FALLON, J. V.; CHEN, S. Bicarbonate produced from carbon capture for algae culture. **Trends in Biotechnology**, v. 9, n. 11, p. 537-541, 2011.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 294-306, 2007.

CHO, D.; CHOI, J.; KANG, Z.; KIM, B. H.; OH, H. M.; KIM, H. S.; RAMANAN, R. Microalgal diversity fosters stable biomass productivity in open ponds treating wastewater. **Scientific Reports**, v. 1979, n. 7, p. 1-11, 2017.

CHO, S.; LEE, N.; PARK, S.; YU, J.; LUONG, T. T.; OH, Y. K.; LEE, T. Microalgae cultivation for bioenergy production using wastewaters from a municipal WWTP as nutritional sources. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 515-520, 2013.

CHO, S.; LUONG, T. T.; LEE, D.; OH, Y.; LEE, T. Reuse of effluent water from a municipal wastewater treatment plant in microalgae cultivation for biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 8639-8645, 2011.

CHOIX, F. J.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Enhanced accumulation of starch and total carbohydrates in alginate-immobilized *Chlorella* spp. induced by *Azospirillum brasilense*: I. Autotrophic conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 51, p. 294-299, 2012.

CHU, S. P. The influence of the mineral composition of the medium on the growth of planktonic algae. Part I: methods and culture media. **Journal of Ecology (Oxford)**, v. 30, p. 284-325, 1942.

CLARENS, A. F.; RESURRECCION, E. P.; WHITE, M. A.; COLOSI, L. M. Environmental life cycle comparison of algae to other bioenergy feedstocks. **Environmental Science and Technology**, v. 44, p. 1813-1819, 2010.

COLLET, P.; SPINELLI, D.; LARDON, L.; HÉLIAS, A.; STEYER, J. P.; BERNARD, O. Life Cycle Assessment of microalgae based biofuels. **Biofuels from Algae**, v. 2, p. 287-312, 2013.

COMISSÃO EUROPEIA. European Commission Directive C. 27 Feb, 1998, amending Council Directive 91/ 271/EEC with respect to certain requirements established in Annex I, vol. 98/15/ EC. Off. J. Eur. Comm., 29–30, 1998.

COSTA, A.; BARBOSA, G. M. C.; MIYAZAWA, M.; GOMES, P. C.; GATTI, I. C. A. Ambiente de Crescimento de Microalgas. In: **Microalgas de águas continentais**. ANDRADE, D. S.; FILHO, A. C. (eds.). Londrina: IAPAR, 2014.

CROFT, M. T.; LAWRENCE, A. D.; RAUX-DEERY, E.; WARREN, J. M.; SMITH, A. G. Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria. **Nature**, v. 438, p. 90-93, 2005.

CRAGGS, R. J.; ZWART, A.; NAGELS, J. W.; DAVIES-COLLEY, R. J. Modelling sunlight disinfection in a high rate pond. **Ecological Engineering**, v. 22, p. 113-122, 2004

ELRIFI, I. R.; TURPIN, D. H. Steady-state luxury consumption and the concept of optimum nutrient ratios: a study with phosphate and nitrate limited *Selenastrum minutum* (Chlorophyta). **Journal of Phycology**, v. 21, n. 4, p. 592-602, 1985.

FALLOWFIELD, H. J.; CROMAR, N. J.; EVISON, L. M. Coliform die-off rate constants in a high rate algal pond and the effect of operational and environmental variables. **Water Science & Technology**, v. 34, p. 141–147, 1996.

FANÉS, I.; SÁNCHEZ, P.; COMAS, A. Contribution to the taxonomic study of the family Botryococcaceae (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) in southern Spain. **Cryptogamie Algologie**, v. 30, n. 1, p. 17-30, 2009.

FENG, Y.; LI, C.; ZHANG, D. Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 101-105, 2011.

FERNANDES, B. D.; MOTA, A.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. Continuous cultivation of photosynthetic microorganisms: approaches, applications and future trends, **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 1228-1245, 2015.

FERRAZ, C. A. M.; AQUARONE, E.; KRAUTER, M. Efeito da luz e do pH no crescimento de *Spirulina maxima*. **Revista de Microbiologia**, v. 16, p. 132-137, 1985.

FLORENCIO, L., AISSE, M. M., BASTOS, R. K. X., PIVELI, R. P. Utilização de Esgotos Sanitários – Marcos Conceituais e Regulatórios. In: **Tratamento e utilização de esgotos sanitários**. FLORENCIO, L., AISSE, M. M., BASTOS, R. K. X., PIVELI, R. P. (coordenadores). Rio de Janeiro: ABES, 2006. p. 1-17.

FOGG, G. E. **Algal cultures and phytoplankton ecology**. Wisconsin: The University of Wisconsin Press. 2nd ed. 1975.

FRICKE, K.; SANTEN, H.; WALLMANN, R. Operating problems in anaerobic digestion plants resulting from nitrogen in MSW. **Waste Management**, v. 27, p. 30-43, 2007.

FUENTES, J. L.; GARBAYO, I.; CUARESMA, M.; MONTERO, Z.; GONZÁLEZ-DEL-VALLE, M.; VÍLCHEZ, C. Impact of microalgae-bacteria interactions on the production of algal biomass and associated compounds. **Marine Drugs**, v. 14, n. 100, p. 1-16, 2016.

GAUR, J. P., RAI, L. C. Heavy metal tolerance in algae. In: **Algal Adaptation to Environmental Stresses: Physiological, Biochemical and Molecular Mechanisms**. RAI, L. C., GAUR, J. P. (eds.). Berlin: Springer-Verlag, 2001. p. 363-388.

GEADA, P.; VASCONCELOS, V.; VICENTE, A.; FERNANDES, B. Microalgal biomass cultivation. In: **Algal Green Chemistry**. RASTOGI, R.; MADAMWAR, D.; PANDEY, A. (eds.). London: Elsevier, 2017. p. 258-278.

GEIDER, R.J.; LA ROCHE, J. Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. **European Journal of Phycology**, v. 37, n. 1, p. 1-17, 2002.

GODOS, I.; BLANCO, S.; ENCINA, P. A. G.; BECARES, E.; MUÑOZ, R. Influence of flue gas sparging on the performance of high rate algae ponds treating agro-industrial wastewaters. **Journal of Hazardous Materials**, v. 179, p. 1049-1054, 2010.

GÓMEZ-SERRANO, C.; MORALES-AMARAL, M. M.; ACIÉN, F. G.; ESCUDERO, J. M.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M.; MOLINA-GRIMA, E. Utilization of secondary-treated wastewater for the production of freshwater microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 16, p. 6931-6944, 2015.

GÓMEZ, C.; ESCUDERO, R.; MORALES, M. M.; FIGUEROA, F. C.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M.; ACIÉN, F. G. Use of secondary-treated wastewater for the production of *Muriellopsis* sp. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 5, p. 2239-2249, 2013

GONÇALVES, A. L.; RODRIGUES, C. M.; PIRES, J. C. M.; SIMÕES, M. The effect of increasing CO₂ concentrations on its capture, biomass production and wastewater bioremediation by microalgae and cyanobacteria. **Algal Research**, v. 14, p. 127-136, 2016.

GONÇALVES, A.L.; PIRES, J. C. M, SIMÕES, M. Wastewater polishing by consortia of *Chlorella vulgaris* and activated sludge native bacteria. **Journal of Cleaner Production**, 2016. doi: 10.1016/j.jclepro.2016.05.109.

GONÇALVES, A. L.; RODRIGUES, C. M.; PIRES, J. C. M.; SIMÕES, M. The effect of increasing CO₂ concentrations on its capture, biomass production and wastewater bioremediation by microalgae and cyanobacteria. **Algal Research**, v. 14, p. 127-136, 2016.

GONÇALVES, R. F.; CHERNICHARO, C. A. L.; ANDRADE NETO, C. O.; SOBRINHO, P. A.; KATO, M. T.; COSTA, R. H. R.; AISSE, M. M.; ZAI, M. Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios por reatores de biofilme. In: **Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios**. CHERNICHARO, C. A. L. (Coord.). Belo Horizonte: Projeto PROSAB 2, p. 171-278.

GONZÁLEZ, A. C. **Las Chlorococcales dulciacuícolas de Cuba**. Berlin: Gebrüder Borntraeger Verlagsbuchhandlung, 1996, 192p.

GONZÁLEZ-CAMEJO, J.; BARAT, R.; PACHÉS, M.; MURGUI, M.; SECO, A.; FERRER, S. Wastewater nutrient removal in a mixed microalgae-bacteria culture: effect of light and temperature on the microalgae-bacteria competition. **Environmental Technology**, v. 39, n. 4, p. 503-515, 2018.

GRIFFITHS, M. J.; HARRISON, S. T. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. **Journal of Applied Phycology**, v. 21, n. 5, p. 493-507, 2009.

GROBBELAAR, J. U. Inorganic algal nutrition. In: **Handbook of Microalgal Culture**, RICHMOND, A.; HU, Q. (eds.). Oxford, UK: John Wiley & Sons, 2013.

GUILLARD, R. R. L. Purification methods for microalgae. In: **Algal Culturing Techniques**. ANDERSEN, R. A. (ed.). London: Elsevier Academic Press, p. 117-132, 2005.

GUIRY, M. D. How many species of algae are there? **Journal of Phycology**, v. 48, n. 5, p. 1057-1063, 2012.

GULDHE, A.; KUMARI, S.; RAMANNA, L.; RAMSUNDAR, P.; SINGH, P.; RAWAT, I.; BUX, F. Prospects, recent advancements and challenges of different wastewater streams for microalgal cultivation. **Journal of Environmental Management**, v. 203, p. 299-315, 2017.

GUTIÉRREZ-ALFARO, S.; RUEDA-MÁRQUEZ, J. J.; PERALES, J. A.; MANZANO, M. A. Combining sun-based technologies (microalgae and solar disinfection) for urban wastewater regeneration. **Science of the Total Environment**. v. 619, p. 1049-1057, 2018.

HAMMOUDA, O.; GABER, A.; ABDEL-RAOUF, N. Microalgae and wastewater treatment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 31, p. 205-210, 1995.

HECKY R.E.; KILHAM, P. Nutrient limitation of phytoplankton in freshwater and marine environments: a review of recent evidence on the effects of enrichment. **Limnology and Oceanography**, v. 33 n. 4, p. 796-822, 1988.

HUSSAIN, F.; SHAH, S. Z.; ZHOU, W.; IQBAL, M. Microalgae screening under CO₂ stress: Growth and micronutrients removal efficiency. **Journal of Photochemistry & Photobiology B: Biology**, v. 170, p. 91-98, 2017.

JEBALI, A.; ACIÉN, F. G.; GÓMEZ, C.; SEVILLA, J. M.; MHIRI, N.; KARRAY, F.; DHOUB, A.; GRIMA, E. M.; SAYADI, S. Selection of native Tunisian microalgae for simultaneous wastewater treatment and biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 424-430, 2015.

KATO, M. T.; ANDRADE NETO, C. O.; CHERNICHARO, C. A. L.; FORESTI, E.; CYBIS, L. F. Capítulo 3: Configurações de Reatores Anaeróbios. In: **Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo**. CAMPOS, J. R. (coord.). Rio de Janeiro, PROSAB/FINEP, 1999. p. 53-99.

KAZAMIA, E.; RISELEY, A. S.; HOWE, C.J.; SMITH, A. G. An engineered community approach for industrial cultivation of microalgae. **Industrial Biotechnology**, v. 10, n. 3, p. 184-190, 2014.

KIM, G. Y.; YUN, Y. M.; SHIN, H. S.; HAN, J. I. Cultivation of four microalgae species in the effluent of anaerobic digester for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 738-742, 2016.

KISSNER, R.; KOPPENOL, W. H. Qualitative and quantitative determination of nitrite and nitrate with ion chromatography. **Methods in Enzymology**, v. 396, p. 61-68, 2005.

KLEIN, B. C.; BONOMI, A.; FILHO, R. M. Integration of microalgae production with industrial biofuel facilities: A critical review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 82, p. 1376-1392, 2018.

KOCHERT G. **Handbook of phycological methods**. London: Cambridge University Press, 1978.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota. In: **Süßwasserflora von Mitteleuropa**. Ettl, H.; Gardner, G.; Heynig, H.; Mollenheuer, D. (eds.). Jena: Gustav Fischer, 1999.

KOMARÉK, J.; MARVAN, P. Morphological differences in natural populations of the genus *Botryococcus* (Chlorophyceae). **Archiv fuer Protisten- kunde**, v. 141, p. 65-100, 1992.

KONG, Q. X.; LI, L.; MARTINEZ, B.; CHEN, P.; RUAN, R. Culture of microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in wastewater for biomass feedstock production. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 160, p. 9-18, 2010.

KUMAR, A.; ERGAS, S.; YUAN, X.; SAHU, A.; ZHANG, Q.; DEWULF, J.; MALCATA, F. X.; LANGENHOVE, H. V. Enhanced CO₂ fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions. **Trends in Biotechnology**, v. 28, p. 371-380, 2010.

LAM, M.K.; LEE, K.T. Microalgae biofuels: a critical review of issues, problems and the way forward. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 673-690, 2012.

LARKUM, A. W. D.; ROSS, I. L.; KRUSE, O.; HANKAMER, B. Selection, breeding and engineering of microalgae for bioenergy and biofuel production. **Trends in Biotechnology**, v. 30, p. 198-205, 2012.

LARSDOTTER, K. Wastewater treatment with microalgae – a literature review. **Vatten**, v. 62, p. 31-38, 2006.

LEE, C. S.; LEE, S.A.; KO, S. R.; OH, H. M.; AHN, C. Y. Effects of photoperiod on nutrient removal, biomass production, and algal-bacterial population dynamics in lab-scale photobioreactors treating municipal wastewater. **Water Research**, v. 68, p. 680-691, 2015.

LEE, S. L.; OH, H.; OH, H.; KIM, H.; AHN, C. Two-phase photoperiodic cultivation of algal–bacterial consortia for high biomass production and efficient nutrient removal from municipal wastewater. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 867-875, 2016.

LI, X.; XU, H.; WU, Q. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 98, p. 764-771, 2007.

LI, Y.; YI-FENG, C.; CHEN, P.; MIN, M.; ZHOU, W.; MARTINEZ, B. Characterization of microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 5138-5144, 2011.

LIPMAN, C. B.; TEAKLE, J. H. Symbiosis between *Chlorella* sp. and *Azotobacter chroococcum* and nitrogen fixation. **The Journal of General Physiology**, v. 7, n. 4, p. 509-511, 1925.

LÓPEZ, C. V. G.; GARCÍA, M. C. C.; FERNÁNDEZ, F. G. A.; BUSTOS, C. S.; CHISTI, Y.; SEVILLA, J. M. F. Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7587-7591, 2010.

LORENZ, M.; FRIEDL, T.; DAY, J. G. Perpetual maintenance of actively metabolizing microalgal cultures. In: **Algal Culturing Techniques**. ANDERSEN, R. A. (ed.). London: Elsevier Academic Press, p. 145-156, 2005.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. São Carlos: Editora RiMa, 2006. 588p.

LV, J.; FENG, J.; LIU, Q.; XIE, S. Microalgal cultivation in secondary effluent: recent developments and future work. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 79, p. 1-18, 2017.

MAHAPATRA, D. M.; CHANAKYA, H. N.; RAMACHANDRA, T. V. Bioremediation and lipid synthesis through mixotrophic algal consortia in municipal wastewater. **Bioresource Technology**, v. 168, p. 142-150, 2014.

MAIER, R. M. Bacterial growth. In: **Environmental Microbiology**. MAIER, R. M.; PEPPER, I. L.; GERBA, C. P. (eds.) 2nd ed. Burlington, California, London: Elsevier Academic Press, 2009. p. 37-54.

MARAIS, G. R. Faecal bacteria kinetics in stabilisation ponds. **Journal of the Sanitary Engineering Division American Society of Civil Engineering**, v. 100, p. 119-139, 1974.

MARKOU, G.; ANGELIDAKI, I.; GEORGAKAKIS, D. Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, p. 631-645, 2012.

MARQUEZ, F. J.; SASAKI, K.; KAKIZONO, T.; NISHIO, N.; NAGAI, S. Growth characteristics of *Spirulina platensis* in mixotrophic and heterotrophic conditions. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 76, p. 408-410, 1993.

- MCGINN, P. J.; DICKINSON, K. E.; PARK, K. C.; WHITNEY, C. G.; MACQUARRIE, S. P.; BLACK, F. J.; FRIGON, J. C.; GUIOT, S. R.; O'LEARY, S. J. B. Assessment of the bioenergy and bioremediation potentials of the microalga *Scenedesmus* sp. AMDD cultivated in municipal wastewater effluent in batch and continuous mode. **Algal Research**, v. 1, p. 155-165, 2012.
- MEDIPALLY, S. R.; YUSOFF, F. M.; BANERJEE, S.; SHARIFF, M. Microalgae as sustainable renewable energy feedstock for biofuel production. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-13, 2015.
- MEIER, L.; BARROS, P.; TORRES, A.; VILCHEZ, C.; JEISON, D. Photosynthetic biogas upgrading using microalgae: Effect of light/dark photoperiod. **Renewable Energy**, v. 106, p. 17-23, 2017.
- MENDES, A.; REIS, A.; VASCONCELOS, R.; GUERRA, P.; LOPES DA SILVA, T. *Cryptocodinium cohnii* with emphasis on DHA production: a review. **Journal of Applied Phycology**, v. 21, p. 199-214, 2009.
- MENEZES, M.; BICUDO, C. E. Flagellate green algae from four water bodies in the state of Rio de Janeiro, Southeast Brazil. **Hoehnea**, v. 35, n. 3, p. 435-468, 2008.
- MENNAA, F. Z.; ARBIB, Z.; PERALES, J. A. Urban wastewater treatment by seven species of microalgae and an algal bloom: biomass production, N and P removal kinetics and harvestability. **Water Research**, v. 83, p. 42-51, 2015.
- MILANO, J.; ONG, H. C.; MASJUKI, H. H.; CHONG, W. T.; LAM, M. K.; LOH, P. K.; VELLAYAN, V. Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuels for power generation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 58, p. 180-197, 2016.
- MOTA, F. S. B.; VON SPERLING, M. Capítulo 1: Introdução. In: **Nutrientes de esgoto sanitário: utilização e remoção**. MOTA, F. S. B., E VON SPERLING, M. (coordenadores). Rio de Janeiro: ABES, 2009. p. 21-25.
- MYERS, J. A.; CURTIS, B. S.; CURTIS, W. R. Improving accuracy of cell and chromophore concentration measurements using optical density. **BMC Biophysics**, v. 6, n. 4, p. 1-15, 2013.

MYERS, J.; GRAHAM, J. R. On the mass culture of algae. II. Yield as a function of cell concentration under continuous sunlight irradiance. **Plant Physiology**, v. 34, p. 345-352, 1959.

NASCIMENTO, I. A.; CABANELAS, I. T. D.; DOS SANTOS, J. N.; NASCIMENTO, M. A.; SOUSA, L.; SANSONE, G. Biodiesel yields and fuel quality as criteria for algal-feedstock selection: effects of CO₂-supplementation and nutrient levels in cultures. **Algal Research**, v. 8, p. 53-60, 2015.

NAYAK, M.; SUH, W. I.; LEE, B.; CHANG, Y. K. Enhanced carbon utilization efficiency and FAME production of *Chlorella* sp. HS2 through combined supplementation of bicarbonate and carbon dioxide. **Energy Conversion and Management**, v. 156, p. 45-52, 2018.

NOAA - NATIONAL OCEANIC AND ATMOSPHERIC ADMINISTRATION. Trends in atmospheric carbon dioxide; 2018. Disponível em: <http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/>. Acesso em: 20 de julho de 2018.

NORTON, T. A.; ANDERSEN, R. A.; MELKONIAN, M. Algal biodiversity. **Phycologia**, v. 35, n. 4, p. 308-326, 1996.

NURDOGAN, Y.; OSWALD, W. J. Enhanced nutrient removal in high-rate ponds. **Water Science and Technology**, v. 31, n. 12, p. 33-43, 1995.

OSWALD, W.J. Micro-algae and wastewater treatment. In: **Microalgal biotechnology**. BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, L. J. (eds.). Cambridge: Cambridge University press, 1988. p. 305-328.

OSWALD, W.J.; GOTAAS, H.B. Photosynthesis in sewage treatment. **Transactions of the American Society of Civil Engineers**, v. 122, p. 73-105, 1957.

PADMAPERUMA, G.; KAPOORE, R. V.; GILMOUR, D. J.; VAIDYANATHAN, S. Microbial consortia: a critical look at microalgae co-cultures for enhanced biomanufacturing. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, n. 5, p. 690-703, 2018.

PANCHA, I.; CHOKSHI, K.; GHOSH, T.; PALIWAL, C.; MAURYA, R.; MISHRA, S. Bicarbonate supplementation enhanced biofuel production potential as well as nutritional stress mitigation in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. **Bioresource Technology**, v. 193, p. 315-323, 2015.

- PARK, J. B. K.; CRAGGS, R. J.; SHILTON, A. N. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 105, n. 3, p.35-42, 2011.
- PASSOS, F.; GUTIÉRREZ, R.; UGGETTI, E.; GARFÍ, M.; GARCÍA, J.; FERRER, I. Towards energy neutral microalgae-based wastewater treatment plants. **Algal Research**, v. 28, p. 235-243, 2017.
- POSADAS, E.; MORALES, M. M. M.; GOMEZ, C.; ACIÉN, F. G.; MUÑOZ, R. Influence of pH and CO₂ source on the performance of microalgae-based secondary domestic wastewater treatment in outdoors pilot raceways. **Chemical Engineering Journal**, v. 265, p. 239-248, 2015.
- PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p. 635-648, 2004.
- PUYOL, D.; BATSTONE, D. J.; HÜLSEN, T.; ASTALS, S.; PECES, M.; KROMER, J. O. Resource recovery from wastewater by biological technologies: opportunities, challenges, and prospects. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-23, 2016.
- RAMARAJ, R.; TSAI, D. W.; CHEN, P. H. An exploration of the relationships between microalgae biomass growth and related environmental variables. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 135, p. 44-47, 2014.
- RAMSUNDAR, P.; GULDHE, A.; SINGH, P.; BUX, F. Assessment of municipal wastewaters at various stages of treatment process as potential growth media for *Chlorella sorokiniana* under different modes of cultivation. **Bioresource Technology**, v. 227, p. 82-92, 2017.
- RASHID, N.; PARK, W. K.; SELVARATNAM, T. Binary culture of microalgae as an integrated approach for enhanced biomass and metabolites productivity, wastewater treatment, and bioflocculation. **Chemosphere**, v. 194, p. 67-75, 2018.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 7ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007, 880p.
- REDFIELD, A. C. The biological control of chemical factors in the environment. **American Scientist**, v. 6, n. 3, p. 205-211, 1958.

RICHMOND, A. Biological principles of mass cultivation of photoautotrophic microalgae. In: **Handbook of Microalgal Culture**. RICHMOND, A.; HU, Q. (eds.). Oxford, UK: Wiley & Sons, Ltd. 2013, p. 169-204.

RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. UK: Wiley-Blackwell, 2004.

ROGERS, J.; ROSENBERG, J.; GUZMAN, B.; OH, V.; MIMBELA, L.; GHASSEMI, A.; BETENBAUGH, M.; OYLER, G.; DONOHUE, M. A critical analysis of paddlewheel-driven raceway ponds for algae biofuel production at commercial scales. **Algal Research**, v. 4, p. 76-88, 2014.

ROSSI, F.; OLGUÍN, E. J.; DIELS, L.; PHILIPPIS, R. Microbial fixation of CO₂ in water bodies and in drylands to combat climate change, soil loss and desertification. **New Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 109-120, 2014.

ROUND, F. E.; CRAWFORD, R. M.; MANN, M. **The diatoms – Biology and Morphology of the genera**. Cambridge-New York: Cambridge University Press, 1990.

RUIZ, J.; ÁLVAREZ-DÍAZ, P. D.; ARBIB, Z.; GARRIDO-PÉREZ, C.; BARRAGÁN, J.; PERALES, J. A. Performance of a flat panel reactor in the continuous culture of microalgae in urban wastewater: prediction from a batch experiment. **Bioresource Technology**, v. 127, p. 456-463, 2013.

SANTOS, C. A.; REIS, A. Microalgal symbiosis in biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 5839-5846, 2014.

SCHMIDT, I.; SLIEKERS, O.; SCHMID, M.; CIRPUS, I.; STROUS, M.; BOCK, E.; KUENEN, J. G.; JETTEN, M. S. M. Aerobic and anaerobic ammonia oxidizing bacteria – competitors or natural partners? **FEMS Microbiology and Ecology**, v. 39, n. 3, p. 175-181, 2002.

SNIFFEN, K. D.; SALES, C. M.; OLSON, M. S. The fate of nitrogen through algal treatment of landfill leachate. **Algal Research**, v. 30, p. 50-58, 2018.

SOUTO, A. R.; ÂNGELO, E. A.; GATTI, I. C. A. Sistemas potenciais de cultivo de microalgas. In: **Microalgas de águas continentais**. ANDRADE, D. S.; FILHO, A. C. (eds.). Londrina: IAPAR, 2014.

SILLS, D. L.; PARAMITA, V.; FRANKE, M. J.; JOHNSON, M. C.; AKABAS, T. M.; GREENE, C. H., TESTER, J. W. Quantitative uncertainty analysis of life cycle assessment for algal biofuel production. **Environmental Science and Technology**, v. 47, p. 687-694, 2013.

SRIRAM, S., SEENIVASAN, R. Microalgae cultivation in wastewater for nutrient removal. **Algal Biomass Utln**, v. 3, p. 9-13, 2012.

STEMMLER, K.; MASSIMI, R.; KIRKWOOD, A. E. Growth and fatty acid characterisation of microalgae isolated from municipal waste treatment systems and the potential role of algal-associated bacteria in feedstock production. **PeerJ**, v. 4, p. 1-17, 2016.

STILES, W. A. V.; STYLES, D.; CHAPMAN, S. P.; et al (14 authors). Using microalgae in the circular economy to valorise anaerobic digestate: challenges and opportunities. **Bioresource Technology**, v. 267, p. 732-742, 2018.

STREBLE, H.; KRAUTER, D. **Atlas de los microorganismos de aguas dulces**. Barcelona: Omega S. A, 1987.

STOKES, P. M.; HUTCHINSON, T. C.; KRAUTER, K. Heavy metal tolerance in algae isolated from lakes contaminated near Sudbury-Ontario. **Canadian Journal of Botany**, v. 51, p. 2155-2168, 1973.

SUH, I. S.; LEE, C. G. Photobioreactor engineering: design and performance. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**. v. 8, n. 6, p. 313-321, 2003.

SUKAČOVÁ, K.; TRTÍLEK, M.; RATAJ, T. Phosphorus removal using a microalgal biofilm in a new biofilm photobioreactor for tertiary wastewater treatment. **Water Research**, v. 71, p. 55-63, 2015.

SUKARNI, S.; SUDJITO, S.; HAMIDI, N.; YANUHAR, U.; WARDANA, I. N. G. Potential and properties of marine microalgae *Nannochloropsis oculata* as biomass biofuel feedstock. **International Journal of Energy and Environmental Engineering**, v. 5, p. 279-290, 2014.

SUTHERLAND, D. L.; HOWARD-WILLIAMS, C.; TURNBULL, M. H.; BROADY, P. A.; CRAGGS, R. J. Enhancing microalgal photosynthesis and productivity in wastewater

treatment high rate algal ponds for biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 222-229, 2015.

SYDNEY, E. B.; STURM, W.; CARVALHO, J. C.; THOMAZ-SOCCOL, V.; LARROCHE, C.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5892-5896, 2010.

TABERNERO, A.; MARTÍN DEL VALLE, E. M.; GALÁN, M. A. Evaluating the industrial potential of biodiesel from a microalgae heterotrophic culture: scale-up and economics. **Biochemical Engineering Journal**, v. 63, p. 104-115, 2012.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 3rd ed. Sinauer Associates, Sunderland, 2002.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, A. L. **Microbiology**. Porto Alegre: Artmed, 2006.

UNNITHAN, V.V.; UNC, A.; SMITH, G. B. Mini-review: a priori considerations for bacteria-algae interactions in algal biofuel systems receiving municipal wastewater. **Algal Research**, v. 4, p. 35-40, 2014.

URASA, I. T.; FEREDÉ, F. The determination of phosphates using ion chromatography: an evaluation of influential factors. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 23, n. 3, p. 189-206, 1986.

VERHULST, P. F. Notice sur la loi que la population suit dans son accroissement. **Corresp. Math. Phys.** v. 10, p. 113-121, 1838.

VILLA, J. A.; RAY, E. E.; BARNEY, B. M. *Azotobacter vinelandii* siderophore can provide nitrogen to support the culture of the green algae *Neochloris oleoabundans* and *Scenedesmus* sp. BA032. **FEMS Microbiology Letters**, v. 351, p. 70-77, 2014.

VON SPERLING, M. Urban wastewater treatment in Brazil. In: **TECHNICAL NOTE Nº IDB-TN-970**. Inter-American Development Bank, 2016. 101 p.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 3^a ed. Belo Horizonte: DESA/UFMG, 2005. 452 p.

VONSHAK, A.; CHEUNG, S. M.; CHEN, F. Mixotrophic growth modifies the response of *Spirulina platensis* (Cyanobacteria) cells to light. **Journal of Phycology**, v. 36, p. 675-679, 2000.

VU, C. H. T.; LEE, H. G.; CHANG, Y. K.; OH, H. M. Axenic cultures for microalgal biotechnology: establishment, assessment, maintenance, and applications. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 2, p. 380-396, 2018.

WANG, B.; LAN, C.Q. Biomass production and nitrogen and phosphorus removal by the green alga *Neochloris oleoabundans* in simulated wastewater and secondary municipal wastewater effluent. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 5639-5644, 2011.

WANG, B.; LI, Y.; WU, N.; LAN, C. CO₂ bio-mitigation using microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, p. 707-718, 2008.

WANG, J.; YANG, H.; WANG, F. Mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production: status and prospects. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 2, p. 3307-3329, 2014.

WEN, Y., HE, Y., JI, X., LI, S., CHEN, L., ZHOU, Y., WANG, M., CHEN, B. Isolation of an indigenous *Chlorella vulgaris* from swine wastewater and characterization of its nutrient removal ability in undiluted sewage. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 247-253, 2017.

WEST-EBERHARD, M. J. Phenotypic plasticity and the origins of diversity. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 20, p. 249-278, 1989.

WILHELM, C.; JAKOB, T. From protons to biomass and biofuels: evaluation of different strategies for the improvement of algal biotechnology based on comparative energy balances. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, p. 909-919, 2011.

WOOD, A. M.; EVERROAD, R. C.; WINGARD, L. M. Measuring growth rates in microalgal cultures. In: **Algal Culturing Techniques**. ANDERSEN, R. A. (ed.). London: Elsevier Academic Press, 2005. p. 269-287.

XIONG, J. Q.; KURADE, M. B.; JEON, B. H. Can microalgae remove pharmaceutical contaminants from water? **Trends in Biotechnology**, v. 36, n. 1, p. 30-44, 2018.

YANG, J., XU, M., ZHANG, X., HU, Q., SOMMERFELD, M., CHEN, Y. Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: water footprint and nutrients balance. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 159-165, 2011.

YUE, D.; YOU, F.; SNYDER, S.W. Biomass-to-bioenergy and biofuel supply chain optimization: overview, key issues and challenges. **Computers and Chemical Engineering**, v. 66, p. 36-56, 2014.

YU, H. F.; JIA, S. R.; DAI, Y. J. Growth characteristics of the cyanobacterium *Nostoc flagelliforme* in photoautotrophic, mixotrophic and heterotrophic cultivation. **Journal of Applied Phycology**, v. 21, p. 127-133, 2009.

YUVRAJ, (no first name); PADMANABHAN, P. Technical insight on the requirements for CO₂-saturated growth of microalgae in photobioreactors. **3 Biotech.** v. 7, n. 2, 2017.

ZARROUK, C. Contribution to the study of a Cyanophyceae: Influence of various physical and chemicals factors on growth and photosynthesis of *Spirulina maxima*. Ph.D. thesis, University of Paris, 1966.

ZHOU, W.; LI, Y.; MIN, M.; HU, B.; CHEN, P.; RUAN, R. Local bioprospecting for high-lipid producing microalgal strains to be grown on concentrated municipal wastewaters for biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6909-6919, 2011.

ZHU, Y. H.; JIANG, J. G. Continuous cultivation of *Dunaliella salina* in photobioreactor for the production of b-carotene. **European Food Research and Technology**, v. 227, p. 953-959, 2008.

